

2m 11. 2865,5

Université de Montréal

Étude sur la germination des graines du *Spiranthes cernua* et du
Cypripedium acaule en présence de champignons mycorhiziens des
Orchidacées.

Par

Louis Dussault

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en biologie végétale

Août 2000

Louis Dussault, 2000



QK

3

U54

2001

v.006

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Étude sur la germination des graines du *Spiranthes cernua* (L.) Rich. et du
Cypripedium acaule Ait. (Orchidacées) en présence de champignons
mycorhiziens des Orchidacées.

Présenté par :

Louis Dussault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Monsieur Peterjorgen Neumann, président du jury

Monsieur J.-André Fortin, directeur de recherche

Monsieur Denis Barabé, codirecteur

Monsieur Marc St-Arnaud, codirecteur

Madame Anne Bruneau, membre du jury

Mémoire accepté le : 12 juin 2001

Sommaire général

Les mécanismes de germination et de colonisation en milieu naturel d'Orchidacées terrestres des régions tempérées demeurent encore méconnues. Cet état de fait est attribuable en partie au manque de renseignements sur le rôle exact des champignons mycorhiziens qui doivent obligatoirement former une symbiose avec la graine en germination.

Pour mieux comprendre les relations entre la plante et son symbiote, nous avons étudié la germination de la graine et le développement de deux espèces d'Orchidacées des régions tempérées en présence de différents champignons connus comme symbiotes d'Orchidacées des régions tempérées de l'Amérique du Nord.

Dans une des deux études, nous avons suivi le développement morphologique du protocorme et des organes du *Spiranthes cernua* depuis la graine jusqu'au stade feuillé, en symbiose avec son symbiote, le *Ceratorhiza goodyerae repentis*. A partir de photographies à la loupe binoculaire, au microscope photonique et au microscope électronique à balayage nous avons pu observer les interrelations morphologiques qui existent entre le champignon et la graine, le protocorme et les organes de la plante.

Nos résultats nous laisse croire que la souche fongique utilisée n'a pas pu, à elle seule, apporter tous les éléments requis par la plantule pour son développement normal lorsque les graines étaient semées sur une

gélose à base d'eau, sans nutriments. Bien que des graines ont germé dans ces conditions, le développement de la plantule s'est effectué anormalement. Nous avons pu constater que le développement symbiotique du *S. cernua* à partir de la graine jusqu'au stade feuillé suivait le mode de développement propre aux Orchidées en général.

L'autre étude porte sur l'effet produit sur le *Cypripedium acaule* par certains champignons provenant d'Orchidacées nord-américaines autres que le *C. acaule* mais croissant en nature sous des latitudes similaires à celles où l'on retrouve cette dernière espèce. En laboratoire, les champignons qui mycorhizent les Orchidacées ne sont pas spécifiques à une espèce donnée d'Orchidacée. Une souche fongique peut mycorhizer plusieurs espèces différentes d'orchidacées. (Arditti, 1992; Clements, Muir et Cribb, 1986; Curtis, 1939). De même, plusieurs souches différentes de champignon peuvent mycorrhizer une espèce d'Orchidacées (Masuhara et Katsuya, 1994; Masuhara, Katsuya et Yamaguchi, 1993).

Des graines du *C. acaule* ont été semées sur quatre milieux gélosés différents dont l'un, à base d'eau, servait de témoin. Chaque boîte de Petri a été inoculée avec l'une des 11 souches fongiques utilisées. Dix boîtes de Petri ont été utilisées pour chacune des souches, plus un traitement sans champignon, et pour chacun des quatre milieux. Aucune symbiose n'a pu être établie, mais l'une des souches, le *Epulorhiza repens* a permis une augmentation significative ($P < 0,001$) du taux de germination des graines.

Nous émettons l'hypothèse que le champignon a produit une substance qui a diffusé dans le milieu ou dans l'atmosphère de la boîte de Petri et que cette substance a influencé le taux de germination des graines.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons aussi tenté d'isoler le symbiote du *C. acaule* avec des graines placées dans des sachets. Ces sachets ont été enfouis sous la litière dans l'environnement racinaire des plantes d'une colonie naturelle. Sur approximativement 10000 à 15000 graines semées, aucune n'a germé.

Ces études indiquent, entre autres, que le champignon n'apporte pas tous les nutriments dont la *graine*, le protocorme et la plante ont besoin pour se développer. Des recherches plus poussées doivent être entreprises pour acquérir une plus grande connaissance des échanges entre les symbiotes. À cause de la rapidité de germination des graines du *S. cernua* et de la facilité de la formation de la symbiose, cette plante et son endophyte nous semblent des sujets de premier choix pour des études sur le développement symbiotique d'Orchidacées terrestres.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
SOMMAIRE GÉNÉRAL	iii
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvii
DÉDICACE	xxi
Étude de la morphogénèse du <i>Spiranthes cernua</i> (L.) Rich. de la graine à la plante feuillée en symbiose avec un champignon mycorhizien compatible.	1
Sommaire	2
Introduction	4
Matériel et méthodes	8
Traitement des graines	8
Microscopie	9
Mise en culture	11
Résultats	13
La graine	13

Naissance du protocorme	15
Émergence de l'écaille et de l'apex	19
Apparition des feuilles	20
Développement des racines	20
Capacités nutritionnelles du champignon	22
Discussion	23
La graine	23
Le proembryon	25
La germination	27
Le symbiote mycorhizien	30
La mycorhize	32
Le protocorme	37
L'écaille	41
L'apex	42
Les racines	42
Éléments nutritifs	44
Conclusion	46
Bibliographie	48

Tentative <i>in situ</i> pour isoler les symbiotes du <i>C. acaule</i> Ait. (Orchidacées) et étude sur la germination <i>in vitro</i> de ses graines en présence de champignons du groupe morphologique des Rhizoctonia	92
Sommaire	93
Introduction	94
Matériel et méthode	97
Traitement des graines	97
Choix des souches fongiques	98
Choix des milieux de croissance	99
Première expérience <i>in vitro</i>	99
Technique d'ensemencement	99
Inoculation des champignons	100
Incubation	100
Deuxième expérience <i>in vitro</i>	101
Choix des capsules	101
Mise en culture des symbiotes	101
Expérience <i>in situ</i>	101
Traitement des graines en sachets	101
Ensemencement	102
Cueillette des sachets	102

Résultats	103
Choix du milieu AB pour le champignon	103
Première expérience <i>in vitro</i>	103
Début de la germination	103
Absence de mycorhize	103
Nombre de graines semées/germées	103
Résultats par souche fongique et par milieu	104
Deuxième expérience <i>in vitro</i>	105
Protocole expérimental	105
Effet de la souche <i>E. repens</i> UAMH 5430	105
Expérience <i>in situ</i>	105
Absence de germination	105
Discussion	107
Méthode de désinfection	107
Sélection des milieux	107
Température d'incubation	108
Motif de la deuxième expérience	108
Taux de germination des graines	109
Effet de la souche <i>E. repens</i> UAMH 5430	109
Résultats antérieurs sur la germination symbiotique	
des graines des <i>Cyripedium sp</i>	109

Causes possibles de l'accroissement	
du taux de germination	110
Raisons de l'absence de germinations de graines	
<i>In situ</i>	113
Conclusion	115
Bibliographie	116
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	129
ANNEXES	
Annexe 1 : déshydratation à l'éthanol	xxii
Annexe 2 : Infiltration à la résine acrylique	xxiii
Annexe 3 : Déshydratation à l'éthanol/butanol III	xxiv
Annexe 4 : Infiltration et montage dans la paraffine	xxv
Annexe 5 : Localisation de l'expérience <i>in situ</i>	xxvi
Annexe 6 : Position des repaires de l'expérience <i>in situ</i>	xxvii

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1 Liste des souches fongiques utilisées	124
Tableau 2 Choix des milieux propices à la croissance des Champignons	125
Tableau 3 Classification de six milieux quant à la rapidité d'induire la croissance de différents isolats fongiques	126
Tableau 4 Nombre de graines semées et de graines germées par milieu et par souche fongique	127
Tableau 5 Effet du <i>Epulorhiza repens</i> UAMH 5430 sur la germination des graines du <i>C. acaule</i>	128

LISTE DES FIGURES

Page

- Fig. 1. Graine du *S. cernua* vue en transparence dans son tégument réticulé avec le proembryon. Fig. 2. Coupe longitudinale d'une graine du *S. cernua* avec son tégument constitué d'une mince enveloppe et son proembryon avec de grosses cellules parenchymateuses basales et les petites cellules méristématiques du sommet. Fig. 3. Graine complète du *S. cernua* vue au MEB; à noter le tégument réticulé. Fig. 4. Coupe de graine du *S. cernua* contenant deux proembryons (polyembryonie).....62
- Fig. 5. Le *C. goodyerae repentis* en contact avec la graine du *S. cernua*. Fig. 6. Le *C. goodyerae repentis* a pénétré par la base du *S. cernua* et a commencé à infecter les cellules de la base. Fig. 7. Graine du *S. cernua* dont le proembryon, toujours dans son tégument, montre une mycorhize normale avec le *C. goodyerae repentis*. Fig. 8. Détails de pelotons et d'hyphes digérées du *C. goodyerae repentis* avec une nouvelle infection dans la même cellule, dans un proembryon du *S. cernua* au début de la mycorhize.....64
- Fig. 9. Hyphe du *C. goodyerae repentis* traversant la paroi d'une cellule du *S. cernua* pour infecter une cellule voisine. Fig. 10. Proembryon du *S. cernua* envahi par le *C. goodyerae repentis*. Fig.

11. Protoderme à la surface d'un protocorme du *S. cernua* Fig. 12.
Naissance d'un rhizoïde à la surface d'un protocorme du *S. cernua*.....66

Fig. 13. Coupe longitudinale d'un rhizoïde du *S. cernua*, mycorhizé
par le *C. goodyerae repentis*, constitué d'une seule cellule. Fig. 14.

Hyphes du *C. goodyerae repentis* en spirales à l'intérieur d'un rhizoïde
du *S. cernua*. Fig. 15. Début du développement du protocorme du
S. cernua mycorhizé par le *C. goodyerae repentis*; le développement
des cellules du pôle antérieur donne un aspect piriforme au protocorme;
les cellules externes se multiplient surtout par division anticline.

Fig. 16. Formation du dôme de la partie antérieure du *S. cernua*;
le protocorme est encore en partie dans le tégument.68

Fig. 17. Apex du *S. cernua* constitué de cellules relativement petites;
Des cellules néoformées sont mycorhizées par le *C. goodyerae*
repentis; de grosses cellules parenchymateuses sont produites à la
base. Fig. 18. Le protocorme du *S. cernua* est complètement libéré
du tégument; Le dôme apical s'est aplati et est maintenant plus large
que long. Fig. 19. Les pôles antérieur et postérieur du *S. cernua* sont
de plus en plus évidents; les cellules de l'apex tendent à former des
files longitudinales. Fig 20. Le développement des cellules de la base
et de l'apex donne au protocorme du *S. cernua* une forme obovoïde.....70

Fig. 21. A cause du développement des cellules de la base de

la région méristématique et du dôme apical, le protocorme du *S. cernua* prend une forme obovoïde; la couche superficielle de cellules forme un épiderme autour du protocorme. Fig. 22.

Cellules du *S. cernua*, mycorhizées par le *C. goodyerae*

Repentis, avec leur noyau. Fig.23. Cellules non-mycorhizées

du *S. cernua* avec leur noyau. A noter la différence de grosseur

des noyaux de cellules mycorhizées et non-mycorhizées. Fig. 24.

Amidon, surtout dans les cellules parenchymateuses du *S. cernua*.....72

Fig. 25. Cellules hébergeantes et cellules digestives du *S. cernua*

mycorhizé par le *C. goodyerae repentis*. Fig. 26. Protocorme complet

du *S. cernua*, mycorhizé par le *C. goodyerae repentis*, laissant voir des

pelotons par transparence. Fig. 27. Bouton apical, initiateur des

structures à venir, du *S. cernua*. Fig. 28. Protocorme complet du

S. cernua montrant la forme conique que prend l'apex.....74

Fig. 29. Formation du procambium du *S. cernua*. Fig. 30. Invagination

qui délimitera le futur apex du *S. cernua* au sommet du proméristème.

De cet apex naîtront toutes les structures de la plante. Fig. 31.

Bourrelet délimitant l'apex du *S. cernua*; de ce bourrelet naîtra

l'écaïlle. Fig. 32. Détails de l'écaïlle naissante du *S. cernua*76

Fig. 33. Coupe montrant l'origine protocormiale de l'écaille du *S. cernua*. Fig. 34. Coupe du *S. cernua* montrant la position du faisceau vasculaire qui s'est formé dans l'écaille. Fig. 35. Détails de la structure du faisceau vasculaire du *S. cernua*. Fig. 36 Détails d'une trachéide du faisceau vasculaire du *S. cernua*78

Fig. 37. Protocorme complet du *S. cernua* au stade de l'initiation de l'écaille. À noter les nombreux rhizoïdes. Fig. 38. Coupe d'un protocorme complet du *S. cernua* au début de la formation de l'apex et du primordium foliaire. Fig. 39. Coupe transversale de l'écaille du *S. cernua* montrant l'épiderme, le mésophylle et le faisceau vasculaire. Fig. 40. Détails de la partie antérieure d'un protocorme du *S. cernua* aux premiers stades de la formation de l'apex et du primordium foliaire.....80

Fig. 41. Coupe transversale de l'écaille et de la première feuille du *S. cernua* montrant les deux faces adaxiales opposées. Fig 42. Première vraie feuille du *S. cernua* opposée à l'écaille. Fig. 43. Première vraie feuille du *S. cernua* dépassant l'écaille qui, elle-même, ne croîtra plus de façon significative. Fig. 44. Tige feuillée montrant l'insertion spiralée des feuilles sur la tige du *S. cernua*.....82

Fig. 45. La racine protocormiale du *S. cernua* débute par un renflement à la hauteur de la naissance de la première feuille. Fig.

46. Racine protocormiale développée du <i>S. cernua</i> . Fig. 47.	
Insertion de la racine protocormiale dans le protocorme du <i>S. cernua</i> . Fig. 48. Poils absorbants à la surface de la racine protocormiale du <i>S. cernua</i>	84
Fig. 49. Coupe de racine du <i>S. cernua</i> montrant le vélamen et l'exoderme du cortex. Fig. 50 Coupe de la racine du <i>S. cernua</i> montrant le cortex avec ses cellules mycorhizées par le <i>C. goodyerae repentis</i> et ses cellules parenchymateuses. Fig 51. Coupe de racine du <i>S. cernua</i> montrant l'endoderme, le péricycle et la stèle. Fig. 52. Coupe de l'extrémité de la racine du <i>S. cernua</i> montrant la coiffe et la région méristématique.....	86
Fig. 53. Cellules du cortex de la racine du <i>S. cernua</i> , mycorhizées par le <i>C. goodyerae repentis</i> . Fig. 54. Espace entre les pelotons d'un protocorme et ceux de la racine du <i>S. cernua</i> , mycorhizés par le <i>C. goodyerae repentis</i> . Fig. 55. Le faisceau vasculaire de la racine est en continuité avec le faisceau vasculaire de la racine protocormiale du <i>S. cernua</i> . Fig. 56. Des racines adventives se développent sur la tige vis-à-vis de la base de feuilles du <i>S. cernua</i>	88
Fig. 57. Protocorme monstrueux du <i>S. cernua</i>	90

Liste des abréviations des légendes

Français	Anglais
Ab = bouton apical	Apical bud
Ac = cellules du pôle antérieur.	Anterior pole cells
Adf = face adaxiale	Adaxial face
Adr = racine adventive	Adventive root
And = divisions anticline	Anticlinal division
Ape = apex	Apex
Apr = bourrelet apical	Apical rim
Cad = dôme apical conique	Conical apical dome
Cn = noyau cellulaire	Cellular nucleus
Cor = cortex	Cortex
Dc = cellules digestives	Digestive cells
Dep = dépression dans le pôle antérieur	Anterior pole depression
Df = forme de dôme	Dome form
Dh = hyphes digérés	Digested hyphae
Ec = cellules épidermiques	Epidermic cells
End = endoderme	Endoderm
Exo = exoderme	Exoderm
Fad = dôme apical aplati	Flat apical dome
Flo = écaille	First leaflike organ

Ftl = première vraie feuille	First true leaf
Gap = espace entre les pelotons du protocorme et de la racine	Gap between root and protocorm pelotons
Hc = cellules hébergeantes	Host cells
Htw = hyphe traversant la paroi cellulaire	Hyphae through cell wall
Hy = hyphes	Hyphae
Inv = proembryon envahi par le champignon	Proembryon invaded by fungus
Ivg = invagination	Invagination
Lp = primordium foliaire	Leaf primordium
Lpc = grosses cellules parenchymateuses	Large parenchymateous cells
Mes = mésophylle	Mesophyll
My = mycélium	Mycelium
Myc = cellules mycorhizées	Mycorrhized cells
Ni = nouvelle infection	New infection
Nic = infection de cellules néoformées	Infection of newly formed cells
Npc = cellules parenchymateuses néoformées	Newly formed parenchymateous cells
Pac = cellules parenchymateuses	Parenchymateous cells
Pc = cellules du pôle postérieur	Posterior pole cells
Pcb = procambium	Procambium

Pdc = cellules du protoderme	Protodermial cells
Pe = peloton	Peloton
Per = pericycle	Pericycle
Prc = protocorme	Protocorme
Prd = protoderme	Protoderm
Pre = proembryon	Proembryon
Prm = proméristème	Promeristem
Pro = insertion de la racine dans le protocorme	Root insertion in protocorme
Prp = racine protocormiale naissante	Protocorm root primordium
Prt = racine protocormiale	Protocormial root
Psp = protocorme piriforme	Pear shaped protocorm
Rfc = cellules en files radiales	Radial file cells
Rh = rhizoïdes	Rhizoids
Rha = poils absorbants	Root hair
Rmc = cellules mycorhizées de la racine	Root mycorrhized cells
Rme = méristème de la racine	Root meristem
Rpc = cellules parenchymateuses de la racine	Root parenchymateous cells
Rtp = coiffe	Root cap
Rvb = faisceau vasculaire de la racine	Root vascular bundle
Sac = petites cellules apicales	Small apical cells

Sc = tégument

Seed coat

Sh = hyphes en spirale

Spiral hyphae

St = amidon

Starch

Ste = stèle

Stele

Svb = faisceau vasculaire de la tige

Stem vascular bundle

Vac = vacuole

Vacuole

Vb = faisceau vasculaire

Vascular bundle

Vbc = cellule du faisceau vasculaire

Vascular bundle cell

Vel = vélamen

Velamen

Dédicace

Je dédie cet ouvrage à mon épouse Marie-Paule qui a su me soutenir, m'encourager et m'assister avec une patience indéfectible dans la préparation de ce mémoire. Je remercie tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leur secours, notamment Mme Louise Pelletier, du laboratoire de microscopie de l'Université de Montréal pour ses suggestions et son aide précieuses dans la préparation des spécimens et l'utilisation des appareils de microscopie, M. Denis Barabé et M. Marc-St-Arnaud, mes deux co-directeurs, pour leurs conseils judicieux, de même que M. J. André Fortin pour m'avoir accepté comme l'un de ses étudiants.

Chapitre 1

Étude de la morphogénèse du *Spiranthes cernua* (L.) Rich., de la graine à la plante feuillée, en symbiose avec un champignon mycorhizien compatible.

Sommaire

La germination et la colonisation en milieu naturel d'Orchidacées terrestres des régions tempérées sont méconnues. Cet état de fait est attribuable, en partie tout au moins, au manque de renseignements sur le rôle exact des champignons mycorhiziens qui doivent obligatoirement former une symbiose avec la graine en germination. Nous avons étudié la morphogénèse du protocorme et des organes de la jeune plantule pour mieux comprendre le développement symbiotique des Orchidacées tempérées et pour établir un cadre de référence solide pour des études ultérieures. Pour ce faire, nous avons étudié le développement du *Spiranthes cernua* (L) Rich., une Orchidacée indigène du Québec, en symbiose avec son endophyte, le *Ceratorhiza goodyerae repentis* (Constantin et Dufour) Moore.

Nos travaux ont été effectués à partir de coupes anatomiques photographiées au microscope photonique, de spécimens ou de parties de spécimens métallisés et photographiés au microscope électronique à balayage et, enfin, de macrophotographies de graines, de protocormes et de plantules à différents stades de développement. Nous avons pu suivre les interrelations symbiotiques du champignon et de la graine, le développement du protocorme, l'apparition des rhizoïdes, le développement de l'écaille, la formation des feuilles, de la racine protocormiale et des racines adventives. Nous avons pu déterminer que le champignon, à lui seul, ne pouvait fournir toutes les substances dont la

graine et le protocorme ont besoin pour leur développement équilibré et complet. Nous avons pu constater que le développement symbiotique du *S. cernua*, à partir de la graine jusqu'à la phase feuillée, suivait le mode de développement propre aux Orchidacées en général. Cependant, chez cette espèce, le développement est rapide pour une Orchidacée, puisqu'il ne s'écoule qu'environ trois semaines entre le début de la germination et l'apparition de la première feuille.

Cette étude nous aide à mieux comprendre le développement morphologique d'une Orchidacée terrestre des régions tempérées en situation symbiotique. Elle nous permet d'observer l'entrée du champignon dans la graine, l'infection des cellules de la base du proembryon, la traversée des parois cellulaires, l'infection de cellules adjacentes à celles déjà mycorhizées, la digestion des pelotons et la réinfection des cellules digestives. Cependant, cette étude indique aussi que le champignon ne semble pas apporter à lui seul tous les nutriments dont la plantule a besoin pour se développer. Des études plus poussées doivent être entreprises afin d'acquérir une plus grande connaissance des échanges physiologiques qui interviennent entre la plantule et son symbiote. Le *S. cernua* avec son endophyte, le *C. goodyerae repentis* peut constituer un excellent matériel pour parfaire ces études, compte tenu de la facilité à établir la relation symbiotique, du court délai requis pour la germination de la graine et de la rapidité de croissance de la plante.

Introduction

La famille des Orchidacées groupe un très grand nombre d'espèces. Dressler (1981) évalue ce nombre à vingt à vingt-cinq mille espèces alors que Cronquist (1981) écrit qu'elle pourrait compter plus de trente cinq mille espèces. La grande majorité de ces espèces sont des plantes tropicales épiphytes. Soulignons cependant qu'il existe de nombreuses Orchidacées terrestres dans les régions tempérées, dont une cinquantaine sont indigènes au Québec (Marie-Victorin, 1995). Or, la germination et la colonisation en milieu naturel des Orchidées terrestres sont méconnues pour la plupart des espèces (Rasmussen et Whigham, 1993). Les Orchidacées des zones tempérées sont beaucoup plus difficiles à faire germer de façon asymbiotique que les espèces tropicales du fait de leur dépendance totale envers le champignon endophyte. Les raisons de cet état de chose ne sont pas claires, étant donné qu'il n'y a que très peu de renseignements sur le rôle exact des champignons mycorhiziens des Orchidacées (Arditti *et al*, 1990). Il semble qu'un jeune plant produit asymbiotiquement n'a que peu ou pas de résistance contre les champignons ou les bactéries pathogènes avant que le processus de symbiose ne se soit établi; par contre, lors du transfert en terre, le jeune plant possédant déjà son symbiote mycorhizien peut commencer immédiatement sa croissance normale tout en ayant acquis une résistance à l'égard des agents pathogènes (Bredy et Black, 1954). L'acquisition de connaissances sur le développement symbiotique de la plante et sur les

relations entre la plantule et son symbiote s'avère donc nécessaire pour la compréhension de la biologie des Orchidacées des régions tempérées.

Dans le but de créer un cadre de référence pour des études ultérieures et pour mieux comprendre l'anatomie des protocormes d'Orchidacées en général et des protocormes d'Orchidacées terrestres en particulier, nous avons étudié en culture symbiotique la morphogénèse du *Spiranthes cernuas* (L.) Rich., à partir de la graine jusqu'à la plante feuillée.

Soulignons qu'il existe déjà des travaux portant sur le développement axénique de certaines Orchidacées (Anderson, 1990; Ballard, 1987; Ballard, 1990; Oliva et Arditti, 1984; Sokolski *et al*, 1997; St-Arnaud, Lauzer et Barabé, 1992; Yoshikazu, Katsuhiko et Suuichi, 1994), sur le développement et la morphogénèse de leurs protocormes (Barabé, St-Arnaud et Lauzer, 1993; Leroux, Barabé et Vieth, 1995; Leroux, Barabé et Vieth, 1997), sur la germination symbiotique (Anderson, 1991; Breddy, 1991; Clements, 1988; Clements, Muir et Cribb, 1986; Masuhara et Katsuya, 1989; Rasmussen, 1990; Smreciu et Currah, 1989; Warcup, 1988; Zettler et Mcinnis, 1992), sur l'isolation et l'identification de leurs symbiotes (Currah, 1987; Currah, Abbott et Sigler, 1996; Currah, Hambleton et Smreciu, 1988; Currah, Sigler et Hambleton, 1987; Currah, Smreciu et Hambleton, 1990; Currah et Zelmer, 1992; Currah *et al*, 1997; Currah, Zettler et Mcinnis, 1997; Ramsay, Sivasithamparam et Dixon, 1987; Warcup, 1991), de même que sur l'ultrastructure des cellules impliquées dans la relation symbiotique entre l'endophyte et la plante

(Peterson et Currah, 1990). Cependant, peu de travaux d'anatomie (Leroux *et al*, 1995, 1997) tenant compte de l'ensemble du protocorme ont été réalisés sur le développement symbiotique des Orchidacées terrestres.

Pour effectuer cette recherche, l'espèce appropriée d'Orchidacée devait être assez commune. Il fallait être en mesure de recueillir les graines facilement, sans affecter ses chances de survie. Le symbiote propice à la germination des graines devait être connu et disponible. Le *Spiranthes cernua* (L.) Rich. répondait bien à ces besoins puisqu'il est relativement abondant, que ses graines sont nombreuses et facilement accessibles et que le champignon, le *Ceratorhiza goodyerae repentis* (Constantin et Dufour) Moore, qui forme une symbiose permettant aux graines de germer sur une gélose à base d'avoine broyée, est connu. Le choix s'est donc arrêté sur cette espèce de plante.

Des travaux antérieurs portant sur des plantes du genre *Spiranthes* *sp.* ont été réalisés, notamment par Masuhara et Katsuya (1994) sur la spécificité hôte/endophyte; Peterson *et al* (1996) et Peterson, Uetake et Zelmer (1998) sur les interactions au niveau cellulaire entre le champignon et son hôte; Uetake, Kobayashi et Ogoshi (1992) sur les changements qui s'opèrent dans le protocorme au niveau ultrastructurel; Zelmer et Currah (1997) sur les symbiotes du *S. lacera*; Zettler (1997) sur l'effet de la lumière quant au taux de germination du *S. odorata*, etc. Zettler et McInnis (1993) ont publié un article portant sur la germination symbiotique du *S. cernua*, cependant il s'agit d'une analyse statistique des taux de germination et de croissance. Nous n'avons trouvé aucune étude portant

sur le développement symbiotique du *S. cernua* traitant de l'ensemble du développement du protocorme et des structures qui s'y rattachent, d'où l'intérêt du présent travail.

Matériel et méthodes :

Traitement des graines.

Les fruits ont été cueillis à l'automne 1996 et à l'automne 1998 à Ste-Cécile-de-Milton, dans la municipalité régionale de comté de la Haute Yamaska, comté de Shefford. Ils ont été séchés à l'air libre et stérilisés en surface par trempage dans du NaOCl 1% durant 15 secondes et rincés en agitant dans de l'eau distillée pendant 15 minutes. Les capsules ont été ouvertes en conditions aseptiques. Les graines ont été conservées dans des fioles disposées dans un contenant en plastique à l'intérieur duquel du CaSO₄ (DRIERITE®) avait été placé. La conservation s'est faite à 4°C jusqu'à utilisation. Le premier lot de graines a été utilisé après 12 à 24 mois suivant la cueillette. Après 24 mois, le taux de germination des graines cueillies en 1996 avait diminué sensiblement. Des graines provenant d'une nouvelle cueillette ont donc été utilisées à partir de novembre 1998.

Pour la stérilisation des graines, des tubes à dialyse en cellulose régénérée poreuse, de marque Fisherbrand®, d'une épaisseur de 20 µm ont été utilisés. La membrane constituant ces tubes permet le passage de molécules de moins de 12-14000 daltons. Les tubes ont été fendus pour former des rectangles de 25 mm par 35 mm avec lesquels des sachets d'environ 8 x 10 mm de côté ont été fabriqués. Une centaine de graines ont été placées dans chaque sachet. Les sachets, par groupes de 3, ont été déposés dans des cassettes porte spécimens (Uni-Cassette®, Sakura

Finetek Corp.) de 4 x 32 x 11 mm. Dans chacune des cassettes avait été inséré un rectangle de filtre mousse de 3 mm d'épaisseur et de la grandeur des portes spécimens comme remplissage, pour empêcher les sachets de se déplacer et de s'ouvrir. Pour fins de stérilisation, les cassettes avec leurs sachets et les graines ont été placées dans des erlenmeyer de 250 ml contenant une solution de 200 ml de NaOCl 0,5 %, additionnée de quelques gouttes de détergent TWEEN 80®. Les fioles ont été laissées 3 minutes sous vide léger et ensuite agitées pendant 8 minutes. Les cassettes et leur contenu ont ensuite été rincés en agitant 3 fois 30 minutes dans de l'eau distillée stérile.

Les sachets contenant les graines ont été ouverts en conditions aseptiques et étendus sur la surface d'une gélose à base d'avoine broyée (AB) (Clements et al, 1986) dans des boîtes de Petri de 100 mm contenant 25 ml de gélose. Dans le cas des graines que nous voulions faire germer avec un symbiote, les ensemencements ont été inoculés à l'aide d'une rondelle de 6,0 mm de mycélium prise sur le front de croissance d'un champignon de l'espèce *C. goodyerae repentis*, cultivé sur milieu AB. Les boîtes de Petri ont été examinées 2 fois par semaine et des prélèvements de protocormes et de pousses ont été effectués au fur et à mesure des besoins, selon leurs stades de développement.

Microscopie.

Pour les fins de microscopie photonique et électronique à balayage, les graines ont été fixées avec une solution de glutaraldéhyde 2,5% et de

formaldéhyde 2,0% dans un tampon phosphate de 1 M à pH 7,4. Deux bains consécutifs, l'un de 60 minutes à température ambiante et l'autre de 120 minutes à 4° C ont été effectués dans cette solution, sous vide léger, suivis de 4 rinçages de 20 minutes chacun dans le même tampon phosphate. La déshydratation a été faite par une série ascendante à l'éthanol (voir annexe I). Pour les coupes à l'ultramicrotome, une infiltration à la résine acrylique L. R. White (London resin) a été réalisée par une série ascendante de résine acrylique dans l'éthanol (voir annexe II). Pour les coupes au microtome, la déshydratation a été faite par une série ascendante de butanol III/éthanol dans l'eau (voir annexe III) suivie d'une infiltration de paraffine par une série ascendante de butanol III/paraffine (voir annexe IV). Les coupes à l'ultramicrotome ont été effectuées à 0,5 – 1 µm. Des coupes sériées de 8 µm ont été exécutées au microtome sur des protocormes avec des racines. Les coupes, montées sur lame de verre, ont été colorées au bleu de toluidine (O'Brien et McCully, 1981) et au fast green (O'Brien et McCully 1981) pour les coupes semi-fines et au bleu de toluidine (O'Brien et McCully, 1981) pour les coupes à 8 µm. Les coupes sur lesquelles on voulait obtenir la coloration de l'amidon ont été colorées avec l'acide périodique de Schiff (O'Brien et McCully, 1981). Les lames ont été examinées et photographiées, au besoin, avec un microscope Axiomat Zeiss et avec une loupe binoculaire Zeiss. Les spécimens traités pour examen au microscope électronique à balayage ont été séchés au point critique avec du CO₂ dans une bombe Polaron. Ils ont été ensuite recouverts d'or et de palladium dans un métalliseur Hummer II.

Un microscope électronique à balayage Jeol JMS-35 a été utilisé dans ce cas.

Mise en culture.

Pour fins de comparaison entre les graines semées avec le *C. goodyerae repentis* et les graines cultivées sans symbiote, 50 boîtes de Petri contenant du milieu AB ont étéensemencées avec des graines du *S. cernua* et inoculées avec le *C. goodyerae repentis*. Comme témoin, 50 autres boîtes de Petri ont étéensemencées sans champignon avec des graines provenant des mêmes lots. Par la suite, une vingtaine de boîtes de Petri ont étéensemencées deux fois par mois avec une centaine de graines et du mycélium pour avoir toujours du matériel frais de tous les stades, selon les besoins.

Afin de mesurer la capacité du *C. goodyerae repentis* d'apporter à la graine en germination tous les nutriments dont elle a besoin pour lui permettre une croissance normale, 20 boîtes de Petri bicompartimentées ont été utilisées. L'un des compartiments contenait du milieu AB alors que l'autre contenait de la gélose à l'eau sans aucun nutriment. Le champignon a été inoculé sur la gélose AB alors que les graines ont été semées sur la gélose à l'eau. Les hyphes ont traversé la paroi entre les deux compartiments des boîtes de Petri et ont éventuellement atteint les graines.

Le poids du proembryon a été déterminé en estimant sa masse spécifique proche de celui de l'eau et en calculant son volume selon la

formule pour le calcul d'un sphéroïde, $\frac{4}{3} \pi ab^2$ où $a = \frac{1}{2}$ longueur et $b = \frac{1}{2}$ largeur (Arditti, Michaud et Healy, 1979). L'ordre de grandeur a été corroboré par une comparaison proportionnelle avec la graine du *Cypripedium acaule* dont nous connaissons les dimensions et la masse (Arditti, 1992).

Résultats

La graine.

Comme chez la plupart des Orchidacées, la graine en dormance du *S. cernua* est petite. Elle est de forme irrégulière mais plutôt fusiforme (Forme 'A' de Clifford et. Smith, 1969) (Fig. 1, 2 et 3) et mesure approximativement $422 \pm 61 \mu\text{m}$ de longueur par $137 \pm 22 \mu\text{m}$ de largeur ($n = 30$). Elle est composée d'une mince enveloppe, correspondant au tégument externe (Fig. 1,2,3 et 4), constituée d'une seule couche de cellules (Swamy, 1949a), sans protoplasme, réticulée et remplie d'air (Fig. 1, 2 et 3). Dans cette graine translucide se trouve un organe plus petit que l'on appelle "proembryon" (Fig. 1, 2 et 3). Ce proembryon mesure en moyenne $140 \pm 45 \mu\text{m}$ de longueur par $72 \pm 17 \mu\text{m}$ de largeur ($n = 30$). Il est de forme obovoïde et est constitué d'une masse d'environ 100 cellules peu différenciées (Fig. 2). Chez le *S. cernua*, le proembryon n'a pas de suspenseur. Comme chez la plupart des Orchidacées, le proembryon du *S. cernua* n'a pas de cotylédon ni de méristème apical, au sens strict, ni de plumule, ni de radicule, ni d'albumen. Il n'y a pas d'amidon détectable dans les cellules du proembryon encore dans la graine. On peut y distinguer un axe antéro-postérieur et deux pôles (Fig. 2). Les plus petites cellules, mesurant $23,5 \pm 4,0 \mu\text{m}$ se retrouvent à la partie antérieure tandis que les plus grosses, mesurant $36,2 \pm 9,7 \mu\text{m}$, sont situées à la partie postérieure ou base ($n = 30$ cellules de chaque type prises sur 6 coupes provenant de 3 graines), soit un coefficient volumétrique de 3,7 fois entre les deux types

de cellules. Les grosses cellules de la base occupent environ les deux tiers du proembryon (Fig. 2), l'autre tiers étant occupé par les petites cellules de la région apicale. De grandes vacuoles peuvent être distinguées dans ces cellules (Fig. 2). Le cytoplasme est dense et les noyaux cellulaires sont bien visibles (Fig. 2). Dans un lot de graines du *S. cernua*, se trouvent souvent des proembryons en dehors du tégument. De même, la présence de plus d'un proembryon dans une graine (polyembryonie) est fréquente (Fig. 4).

Dans les jours qui suivent son ensemencement sur gélose, le volume du proembryon augmente par imbibition. Il demeure normalement à l'intérieur du tégument, car l'augmentation de son volume n'est pas suffisante pour déchirer le tégument. A ce stade, dans les conditions expérimentales suivies, un champignon compatible doit infecter la graine pour que la germination se poursuive. En l'absence du champignon, il n'y a que peu ou pas de divisions cellulaires et le développement de la graine s'arrête alors. Aucune des graines semées sans champignon mycorhizien n'a germé. Dans le premier lot de 50 boîtes de Petri inoculé avec *le C. goodyerae repentis*, le taux de germination des graines semées, calculé jusqu'au stade de la 1^{ère} feuille, a été de 3.2% .

Lorsque le milieu a été inoculé avec une souche mycorhizienne appropriée et compatible, soit dans la cas présent *le C. goodyerae repentis*, les hyphes du champignon atteignent éventuellement la graine (Fig. 5) et pénètrent à travers le tégument (Fig. 6). Elles infectent les cellules de la base du proembryon (Fig. 6) et forment à l'intérieur de ces

cellules des structures constituées d'hyphes enchevêtrées, en forme de boule, appelées pelotons (Fig. 7, 8). Très tôt après l'infection primaire, alors que le proembryon est encore à l'intérieur du tégument, les cellules infectées commencent à digérer les hyphes du peloton (Fig. 8). Des dépôts marquent les restes d'hyphes (Fig. 8). Sur la fig. 8, il est possible de distinguer le début d'une nouvelle infection. Pour infecter d'autres cellules, l'hyphe se rétrécit et passe à travers les parois cellulaires (Fig. 9). Elle forme des pelotons dans les cellules nouvellement envahies (Fig. 9). L'infection se transmet à d'autres cellules basales mais jamais aux cellules de la région apicale, sauf lorsqu'il y a invasion pathologique de tout le protocorme. En effet, dans certains cas, le champignon peut parasiter le proembryon et le détruire (Fig. 10).

Naissance du protocorme

Une couche de cellules minces et allongées entoure le proembryon en formant un protoderme (Fig. 11) Une dizaine de jours après l'infection, des rhizoïdes, constitués chacun d'une seule cellule très allongée, commencent à se former à la base du proembryon à partir des cellules superficielles du protoderme (fig. 12, 13). Rapidement, les rhizoïdes sont infectés par des hyphes (Fig. 13). Ces hyphes forment une spirale à l'intérieur du rhizoïde (Fig. 14) mais ne forment jamais de pelotons.

La croissance du proembryon se poursuit principalement à partir de cellules méristématiques de la région apicale qui se structurent en se divisant rapidement (Fig. 15). Le protocorme prend rapidement une forme

piriforme (Fig. 15). Il n'y a pas de plan de division privilégié. Cependant, les cellules de la couche externe se développent principalement par divisions périclines pour permettre l'accroissement en volume du proembryon (Fig. 15). Sur la figure 15, il mesure 195 μm de longueur par 156 μm de largeur à la hauteur de la région apicale, maintenant la région la plus large. La région apicale prend la forme de dôme (Fig. 16). Deux types de cellules se forment dans cette région : de petites cellules forment l'apex alors que de grosses cellules parenchymateuses se développent à la partie inférieure du méristème (Fig. 17). Les cellules inférieures ont un volume de plus de douze fois le volume des cellules apicales (Fig. 17) (moyenne de 10 cellules de chaque sorte). Des cellules parenchymateuses néoformées commencent à être infectées par le champignon (Fig. 17). A ce stade, le volume du proembryon a augmenté au point de déchirer le tégument (Fig. 18,19). Il est devenu un protocorme. L'élargissement de la région apicale est de plus en plus marqué. La partie antérieure du protocorme forme un dôme aplati plus large que long (Fig. 18). Les pôles antérieur et postérieur et l'axe de symétrie sont de plus en plus évidents (Fig. 19). Les cellules de la région apicale ont tendance à se développer parallèlement à l'axe antéro-postérieur du protocorme et à former des files radiales (Fig. 19).

A un stade plus avancé, la multiplication des cellules de la base de la région méristématique et l'élongation du dôme apical donne au protocorme une forme obovoïde (Fig. 20, 21). Une couche superficielle de cellules allongées forme un épiderme autour du protocorme (Fig. 21). Les

petites cellules de la région apicale n'occupent toujours qu'une partie relativement faible du protocorme (moins de 20%) et les grosses cellules parenchymateuses en occupent la plus grande partie (Fig. 21). Le volume moyen d'une grosse cellule parenchymateuse est de 20 fois celui d'une petite cellule apicale. Le volume du noyau des petites cellules apicales est de 10 fois plus petit que celui des cellules parenchymateuses non mycorhizées (Fig. 21). Les cellules mycorhizées (Fig. 22) sont de dimensions comparables aux cellules parenchymateuses de réserve (Fig. 23). Cependant, la colonisation de cellules par le champignon *C. goodyerae repentis* provoque une hypertrophie des noyaux de ces cellules. Leur diamètre est de $30,7 \pm 5,9 \mu\text{m}$ (Fig. 22) et leur volume est quatre fois supérieur à celui des cellules parenchymateuses non-mycorhizées dont le diamètre est de $19,2 \pm 4,2 \mu\text{m}$ (Fig. 23) ($n = 30$ cellules de chaque sorte). Les cellules parenchymateuses non mycorhizées contiennent une forte quantité d'amidon (Fig. 24). Les cellules méristématiques de la région apicale, de même que les cellules mycorhizées de la base ne contiennent que peu ou pas d'amidon (Fig. 24). Les cellules corticales mycorhizées de la base du protocorme se distinguent en cellules hébergeantes et en cellules digestives (Fig. 25). Les cellules hébergeantes, c'est à dire celles qui contiennent du mycélium sans le détruire, sont immédiatement sous l'épiderme alors que les cellules digestives, c'est à dire celles qui lysent et extraient des nutriments du champignon, sont plus à l'intérieur (Fig. 25). Le protocorme de la Fig. 26 mesure $717 \mu\text{m}$ de long par $450 \mu\text{m}$ de large. Il est complètement hors du

tégument. Des pelotons sont visibles, par transparence (Fig. 26), à la base d'un protocorme complet. L'activité méristématique se poursuit. La région apicale montre un niveau d'organisation plus élevé. Un bourgeon apical, initiateur des structures à venir, s'élabore (Fig. 27). De nombreux rhizoïdes d'origine épidermique sont visibles à la surface médio-basale du protocorme. (Fig. 28). Le sommet du dôme apical s'accroît et devient de forme conique (Fig. 28). Le protocorme de la photo 28 mesure 975 μm de longueur par 725 μm de largeur. À ce stade, on peut distinguer plusieurs zones nettement différenciées (Fig. 27). À la surface du protocorme, on trouve une couche de cellules épidermiques. Dans la partie postérieure du protocorme, immédiatement sous cette couche, on trouve de grosses cellules qui contiennent du mycélium non digéré. Plus profondément, mais toujours dans la partie basale, on observe des cellules mycorhizées propres à la digestion des hyphes. Encore plus profondément, on trouve une zone de cellules parenchymateuses qui s'étend des cellules mycorhizées jusqu'au cellules méristématiques de la région apicale. Ces cellules parenchymateuses contiennent de grandes quantités d'amidon. Les cellules méristématiques occupent la partie antérieure du protocorme depuis les cellules parenchymateuses jusqu'à la pointe du proméristème. Au centre du protocorme, le procambium (Fig. 29) commence à se différencier à partir des cellules méristématiques. Ce procambium donnera naissance à un faisceau vasculaire basipète qui rejoindra les cellules parenchymateuses.

Émergence de l'écaille et de l'apex

Environ quinze jours après la germination, le dôme apical se développe et une invagination se forme au sommet du proméristème (Fig. 30). Sur l'un des cotés de cette invagination, une activité méristématique plus intense peut être observée. Cette activité intense génère une protubérance (Fig. 31). Cette protubérance correspond aux premiers stades du développement de l'écaille qui embrasse l'apex (Fig. 32). Cette écaille ne provient pas de l'apex mais bien d'un prolongement du protocorme lui-même (Fig. 33). L'apex prend corps dans l'invagination en adoptant une forme arrondie, convexe (Fig. 33). C'est à partir de cet apex que se développera l'ensemble de l'axe feuillé. Dans l'écaille en formation s'installe un faisceau vasculaire unique (Fig. 34, 35, 36). De nombreux rhizoïdes disposés dans la partie inférieure du protocorme sont visibles à la loupe binoculaire (Fig. 37).

Le développement de l'écaille se poursuit. Lorsque l'écaille atteint une longueur d'environ 500 μm , elle se replie vers le haut par un phénomène de géotropisme (Fig. 38). A ce stade, le protocorme de la figure 37 mesure 1,6 mm de long par 0,78 mm de large. La plus grande partie de la masse (plus de 80%) est constituée de grosses cellules parenchymateuses qui peuvent être mycorhizées ou non (fig. 38). Les cellules parenchymateuses du tiers inférieur sont mycorhizées alors que la partie antérieure, au dessus des cellules parenchymateuses non mycorhizées, est constituée des cellules méristématiques, de l'écaille et de l'apex à partir duquel se développera un premier primordium foliaire (Fig.

38). Des coupes transversales montrent que la surface de l'écaille est formée d'une couche de cellules épidermiques (Fig. 39). Le mésophylle, longitudinalement irrigué par un faisceau vasculaire, est constitué de cellules semblables et de grandeur similaire, sans parenchyme palissadique discernable (Fig. 39). L'apex qui donnera l'axe feuillé se développe conjointement à l'expansion de l'écaille. Sur le flanc de l'apex, à la partie opposée à l'écaille, prend forme le premier primordium foliaire (Fig. 40) qui se développe à l'intérieur du tube formé par l'écaille (Fig. 41, 42).

Apparition des feuilles

Environ trois semaines après la germination, la première vraie feuille commence à se développer. (Fig. 41, 42). Cette feuille est symétriquement opposée à l'écaille. Sa face adaxiale fait face à la face adaxiale de l'écaille (Fig. 41). Elle se développe rapidement et dépasse bientôt l'écaille qui cesse de croître (Fig. 43). Une deuxième feuille prend place sur la tige en formation. D'autres feuilles naissent et la phyllotaxie est spiralée (Fig. 44).

Développement des racines

Lorsque le semis atteint environ 25 mm de longueur, une racine protocormiale se forme au point de rencontre de la tige et du protocorme, à la hauteur de la base de la première vraie feuille. D'abord simple saillie à la surface du protocorme (Fig. 45), elle atteint 10 mm une dizaine de jours

après son apparition (Fig. 46). Elle est épaisse, trapue et sans ramification (Fig. 46). Cette racine, de nature exogène, prend son origine de cellules sub-épidermiques (Fig. 47). Elle est couverte de poils absorbants (Fig. 48). Les coupes anatomiques montrent qu'elle est formée d'abord d'une couche de cellules épidermiques, le vélamen (Fig. 49), où prennent forme les poils absorbants. Vient ensuite vers l'intérieur l'exoderme, formé d'une couche unique de cellules (Fig. 49), constituant la partie extérieure du cortex (Fig. 50). Le cortex comprend aussi des cellules parenchymateuses infectées (Fig. 51), non infectées (Fig. 51) et l'endoderme (Fig. 51). Finalement, on trouve la stèle, dont la couche extérieure de cellules forme le péricycle (Fig. 51) La stèle contient les faisceaux vasculaires (xylème et phloème). Le méristème apical et la coiffe sont aussi visibles (Fig. 52).

La racine est fortement mycorhizée (Fig. 53), mais les hyphes qu'elle renferme ne proviennent pas de colonisateurs intercellulaires internes. Les cellules mycorhizées du protocorme n'atteignent pas le niveau où apparaît la racine protocormiale (Fig. 54). Aucune hyphe provenant de l'intérieur du protocorme n'a été décelée dans les coupes sériées que nous avons exécutées sur trois protocormes. L'infection de la racine se fait par un mycélium extérieur. Les pelotons dans la racine n'occupent que des cellules de la région interne du cortex. L'exoderme et l'endoderme ne sont pas infectés, non plus que la stèle, le méristème apical ou la coiffe (Fig. 50,51,52,53). Les cellules entre la racine et la tige se différencient en formant des vaisseaux et la stèle est en continuité avec le faisceau vasculaire de la tige (Fig. 55).

Lorsque le développement a atteint un stade plus avancé et que des feuilles sont déjà en place le long de la tige, des racines adventives de structure similaire à la racine protocormiale apparaissent, toujours vis-à-vis de la base d'une feuille (Fig. 56). À ce stade, le protocorme a complété sa transformation en jeune plant et pourrait continuer son développement normal si il était placé en terre dans des conditions appropriées.

Capacité nutritionnelles du champignon

Une partie de l'expérience portait sur la capacité du champignon de fournir tous les nutriments dont la graine avait besoin pour germer et produire une plante normale. Dans les 20 boîtes de Petri bicompartimentées contenant, d'une part du milieu AB et d'autre part du milieu EAU, les hyphes ont traversé la barrière médiane, ont atteint les graines et leur ont apporté des nutriments. Six graines ont germé et ont connu un certain développement. Toutefois, le développement du protocorme qui s'en est suivi s'est fait de façon anarchique et désordonnée (Fig. 57), sans organisation précise.

DISCUSSION

La graine

Les Orchidacées forment une famille de plantes dont les graines sont parmi les plus petites des Angiospermes. Il y a, dans cette famille des espèces dont les graines sont extrêmement petites comme, par exemple, *Acanthephippium sylhetense* (0,66 µg); *Angraecum veitchii* (0,70 µg); *Anguloa ruckeri* (0,39 µg); *Didymoplexis pallens* (0,45 µg); *Schomburgkia undulata* (0,3 µg. (Arditti, 1992). La petitesse des graines est commune à de nombreuses espèces d'Angiospermes qui, comme les Orchidacées, sont myco-hétérotrophes au moins pour une partie de leur existence (Leake, 1994). Soulignons qu'il n'y a pas de plantes myco-hétérotrophes chez les Gymnospermes. Le terme myco-hétérotrophe est utilisé par Leake pour distinguer entre les plantes hétérotrophes dont les apports nutritifs sont faits par un champignon et les plantes hétérotrophes qui obtiennent leurs nutriments par saprophytisme ou par parasitisme. On retrouve des représentants des plantes myco-hétérotrophes dans la classe des Dicotylédones (Pyrolacées, Monotropacées, Polygalacées et Gentianacées) et des Monocotylédones (Pétrosaviacées, Triuridacées, Geosiridacées, Burmanniacées, Corsiacées et Orchidacées). Elles produisent généralement des graines minuscules, ovoïdes ou allongées avec, souvent, un tégument mince de forme fuselée ou, plus rarement, ailée; ces graines sont relâchées d'une capsule et transportées par le vent ou la pluie. Malgré l'éventail taxonomique des familles représentées, la

grosseur de ces graines est, de façon surprenante, relativement constante. Elles ne dépassent que rarement 1 mm dans la plus grande dimension. La largeur des plus petites est d'aussi peu que 50 μm comme pour les graines des *Voyria sp.* de la famille des Gentianacées (Leake, 1994). Il y a là une adaptation propre aux stratégies de dispersion et de germination des plantes myco-hétérotrophes (Leake, 1994). À cause de la légèreté de ces graines, elles peuvent être transportées sur des distances considérables par le vent à maturité, lorsqu'elles sont libérées de leur capsule (Arditti, 1992). Comme ces plantes doivent recevoir tous leurs nutriments d'un champignon symbiote, leur stratégie d'utilisation maximale des ressources en vue de la reproduction est de produire le plus grand nombre de graines possible (Benzing, 1981), lesquelles, par conséquence, doivent être extrêmement petites (Maas et Ruyters, 1986), avec des réserves de glucides minimales, de façon à maximiser la probabilité d'une rencontre avec le symbiote. Le phénomène de la petitesse des graines est relié aux stratégies de dispersion et de germination de beaucoup de plantes ayant un mode de vie parasitique, saprophytique, mycotrophique ou insectivore.

Chez le *S. cernua*, la graine est typique des graines d'Orchidacées : petite, allongée, remplie d'air et très légère, tégument mince et translucide, réticulé. Le volume d'un proembryon de *S. cernua* est d'environ $1,3 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$ et son poids est d'environ $1,3 \mu\text{g}$. Il n'est constitué que d'une centaine de cellules.

Selon certains auteurs, les graines de *Spiranthes sp.* auraient une vie courte (Anderson, 1990; Stoutamire, 1974). Selon d'autres, les

espèces Nord Américaines demeurent viables pour une période considérable si elles sont conservées dans un endroit frais et humide (Curtis, 1936; Rasmussen, 1995). Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec les conclusions de Curtis (1936) et de Rasmussen (1995), puisque des graines germaient encore 24 mois après la cueillette des capsules.

Le proembryon

A l'intérieur de la graine des Orchidacées, l'on trouve une masse de cellules peu différenciées, le proembryon. Il porte le nom de proembryon parce qu'il présente une symétrie axiale avec deux pôles plutôt que la symétrie bilatérale que l'on retrouve généralement dans les embryons de monocotylédones ou la symétrie en croix dans les embryons de dicotylédones (Barabé *et al*, 1993). Les structures normalement visibles dans l'embryon d'une plante ne se sont pas encore développées. D'après Souèges (1936), "on doit entendre par proembryon, le corps embryonnaire dérivé de l'oospore, présentant la symétrie simplement axiale de cette cellule et la conservant pendant toute la période qui précède la formation des cotylédons". Il ajoute : "Beaucoup de formes embryonnaires ne dépassent pas, dans la graine, le stade de proembryon; c'est le cas d'un grand nombre de monocotylédones, de certains *Juncus*, des Orchidées".

La différence entre la dimension des cellules des deux pôles du proembryon démontre au moins une certaine différenciation structurelle dans le proembryon (Yeung et Law, 1992), même si les cellules sont peu

différenciées. Une différence structurelle peut aussi exister entre les cellules superficielles et les cellules plus profondes (Clements, 1988; Harrison, 1977; Manning et van Standen, 1987). Les premières ne seront jamais mycorhizées et pourront produire des rhizoïdes. C'est le cas du *S. cernua* : les rhizoïdes sont des prolongements formés à partir de cellules superficielles alors que les cellules plus profondes de la base, appelées à être mycorhizées, ne produiront jamais de rhizoïdes.

Le proembryon des Orchidacées n'a pas, de façon générale, de cotylédon. Il s'agit là d'une caractéristique générale qui ne souffre que quelques exceptions (Peterson *et al*, 1998), dont les *Dendrobium glumaceum*, *Sobralia macrantha*, *Bletilla striata*, *Arundina graminifolia*, *Epidendrum vitelinum*, *Polystachya microbambusa* et *Thunia marshalliana* (Arditti, 1992). Une autre caractéristique générale des Orchidacées est l'absence d'albumen. Chez les Angiospermes, l'un des noyaux du grain de pollen fusionne avec l'oosphère pour former le zygote alors que l'autre fusionne avec les deux noyaux polaires pour former une cellule triploïde qui se développe en albumen. Chez la plupart des Orchidacées, cette dernière fusion se produit mais la cellule triploïde dégénère éventuellement et il n'y a pas formation d'albumen. Les raisons de l'absence d'albumen chez les Orchidacées n'ont pas encore été élucidées (Arditti, 1992). Le proembryon du *S. cernua* obéit à la règle générale chez les Orchidacées : il n'a ni albumen, ni cotylédon.

Dans le genre *Spiranthes* sp., toutes les cellules originales issues des deux premières divisions du zygote, y compris celle du suspenseur,

participent à l'élaboration du proembryon. Cette espèce fait partie du groupe A de Garay (1960). Ce type de division des premières cellules est considéré comme primitif (Arditti, 1992). On le retrouve chez quelques genres, dont *Cypripedium*, *Listera*, *Neottia* et *Spiranthes*. Le proembryon du *S. cernua* ne fait pas exception à cette règle. Il n'a pas de suspenseur.

Chez le *S. cernua*, se développent fréquemment des graines polyembryoniques (Arditti, 1992; Swamy, 1949 b) ainsi que nous avons pu l'observer. Les systèmes de reproduction des plantes du genre *Spiranthes* sont très diversifiés et incluent l'agamospermie, l'autogamie et la fécondation croisée (Catling, 1990). Selon Schmidt et Antlfinger (1992) la polyembryonie est utilisée comme indicateur de l'agamospermie des graines chez le *S. cernua*.

La germination

Pour Stoutamire (1964) les différentes espèces de *Spiranthes* tolèrent de nombreux substrats utilisés pour la germination *in vitro*. Les graines des *S. cernua*, *S. sinensis* et *S. romanzoffiana* germeraient aisément sur de l'eau. Pour Anderson (1991), le *S. magnicamporum* aurait un taux de germination plus élevé sur de l'agar à l'eau que celui sur d'autres milieux. Masuhara et Katsuya (1989) et Peterson *et al* (1998) rapportent, quant à eux, une absence de germination des graines du *S. sinensis* var. *amoena* semées asymbiotiquement sur milieu AB. Nos résultats se rapprochent plutôt de ceux de Masuhara et Katsuya (1989) et de Peterson *et al* (1998) puisque que nous n'avons constaté aucune

germination des graines semées axéniquement. Seulement 6 graines sur environ 2000, soit 0,3%, ont germé sur la gélose EAU en symbiose avec le champignon.

Le *S. cernua* produit fréquemment des graines dont le tégument est ouvert et dont un ou des proembryons saillit. Anderson (1990) rapporte que des proembryons libres, hors du tégument, sont aussi visibles. Les lots de graines du *S. cernua* utilisés contenaient de nombreux embryons en partie ou entièrement hors du tégument. De ce fait, il était difficile de discerner si les graines étaient au tout début de la germination et si le proembryon avait brisé le tégument ou s'il s'agissait de proembryons extra-tégumentés. Si il y avait eu développement des protocormes, avec des rhizoïdes discernables, les graines étaient considérées comme ayant germées. C'est le critère utilisé par Rasmussen (1990) dans une étude portant sur *Dactylorhiza majalis*. Il est possible que le tégument des graines ait été fendu sur la gélose EAU ou sur la gélose AB mais que leur développement se soit arrêté au tout début de la germination, ce qui pourrait expliquer pourquoi Stoutamire (1964, 1974) et Anderson (1991) constatent un taux de germination élevé sur EAU alors que le nôtre est très bas. Dans le cas du *S. odorata* (synonyme *S. cernua* var. *odorata*), Zettler, Barrington et McInnis (1995) rapportent que les graines témoins semées sans symbiote fongique ne se développaient pas au delà du stade correspondant à la rupture du tégument, ce qui est tout à fait similaire aux résultats que nous avons constatés.

Chez les Orchidacées, la plus grande partie du contenu cytoplasmique des cellules du proembryon est constituée des réserves protéiques et lipidiques et les organelles sont peu nombreuses (Antlfinger, 1993). Cependant, comme le proembryon ne dispose pas de glyoxysome (Harrison, 1977; Manning et van Standen, 1987) les lipides ne peuvent pas être transformés en glucides assimilable au moment de la germination.

L'absence d'amidon chez les Orchidacées est probablement une caractéristique générale de cette famille (Burgeff, 1959). Cette caractéristique a été relevée chez plusieurs espèces par de nombreux auteurs (Harrison, 1977; Manning et van Standen, 1987; Rasmussen 1990; Richardson, Peterson et Currah 1992). Cependant, il y a quelques exceptions à cette règle (Rasmussen, 1995). Chez le *Calypso bulbosa*, à la déhiscence du fruit, l'amidon est un important produit de réserve du proembryon, à l'intérieur de la graine (Yeung et Law, 1992); Rasmussen (1995) cite aussi Mei-sheng *et al* (1985) et Shun-xing & Jin-tang (1990) à l'effet que des dépôts d'amidon seraient apparemment présents dans *Bletilla striata* et *Cymbidium ensifolium*. Nous n'avons pas décelé la présence d'amidon dans les graines de *S. cernua*.

Dans les premiers jour après l'ensemencement, il y a augmentation du volume du proembryon. Ce gonflement est attribuable à l'imbibition d'eau qui cause l'augmentation du volume des cellules, surtout dans les plus grosses cellules de la partie inférieure (Rasmussen, 1990, 1995). Cette absorption d'eau déclenche une série de processus physiologiques qui résultent en un changement irréversible dans les réserves et les

organelles du proembryon (Peterson et al, 1998). Le proembryon du *S. cernua* suit ce processus physiologique et laisse voir une augmentation de volume, insuffisante toutefois pour briser le tégument. Il ne se rompra que lorsque le volume du proembryon aura augmenté encore plus par division cellulaire.

Le symbiote mycorhizien

Les champignons qui entrent en symbiose avec les Orchidacées sont la plupart du temps des champignons du groupe morphologique des *Rhizoctonia* (Andersen et Stalpers, 1994; Bernard, 1909; Currah, 1987, 1991; Hadley, 1982; Marchisio et al, 1985; Smreciu et Currah, 1989; Warcup, 1967; Warcup et Talbot, 1962; Williamson et Hadley, 1970; Zelmer, Cuthbertson et Currah, 1996; Zettler, 1998), groupe dans lequel on retrouve des genres de champignons phylogénétiquement éloignés (Moore, 1987), mais ayant des caractéristiques superficielles similaires, comme des hyphes relativement larges, colorées, septées, qui se divisent d'abord à angle aigu et ensuite presque à angle droit (Warcup, 1966), souvent imparfaits (Williamson et Hadley 1970). Certaines Orchidacées forment avec des champignons ectomycorhiziens d'autres espèces végétales une triple mycorhize (Peterson et al, 1998; Rasmussen, 1995; Warcup, 1985). Elles sont alors des épiparasites des plantes autotrophes avec lesquelles des champignons forment des ectomycorhizes. Par exemple, le *Corallorhiza trifida* a un symbiote jaune brillant avec des anses d'anastomose qui peut former des symbioses de type Orchidacée de

même que des ectomycorhizes (Zelmer et Currah, 1995). Un lien a été établi entre d'autres Orchidacées et des champignons ectomycorhiziens tels que les *Russula sp* et *Tomentella sp* avec le *Corallorhiza sp.* (Taylor et. Bruns, 1996) et avec des champignons pathogènes comme l'*Armillaria sp.* avec le *Galeola septentrionalis* (Terashita et Chuman, 1987), *Erythromyces sp.* avec l'*Erythrorchis sp* (Umata, 1995), le *Ceratobasidium cerealis* avec le *Goodyera repens* (Peterson et Currah, 1990), le *Thanatephorus cucumeris* avec le *Dactylorhiza purpurella* (Williamson et Hadley, 1970), etc.

Pour notre travail, le champignon que nous avons utilisé comme symbiote du *S. cernua* est le *C. goodyerae repentis* (Constantin et Dufour) Moore. Ce champignon fait partie du groupe morphologique des *Rhizoctonia*. Il s'appelait d'ailleurs, à l'origine, *Rhizoctonia goodyerae repentis* Constantin et Dufour. Son téléomorphe est le *Ceratobasidium cornigerum* (Bourd.) Rogers (Currah et al, 1990). Il est communément trouvé comme symbiote dans la mycorhize des Orchidacées matures (Currah et al, 1990). Il est constitué d'hyphes assez larges (4-5 µm), à croissance rapide. Il s'étend sur la gélose en formant une couche de cercles concentriques de couleur brunâtre à orangée, d'où émerge un abondant mycélium aérien duveteux. Sur gélose AB, il entre spontanément en mycorhize avec le *S. cernua*. C'est la raison de son utilisation.

Chez le *S. cernua*, le *C. goodyerae repentis* que nous avons utilisé épouse la forme d'une spirale dans les rhizoïdes. Nous n'avons pas retrouvé de commentaire à cet effet dans la littérature. Cependant, cette

forme nous paraît plausible puisque souvent on peut apercevoir des hyphes enroulées en spirale autour de racines ou d'objets lorsque l'on examine du sol de surface pris dans la litière en forêt. De plus, on peut concevoir un peloton comme étant un enroulement très serré d'hyphes, donc comme une structure pouvant s'assimiler à une spirale.

La mycorhize

Les Orchidacées ne peuvent germer et croître que si on leur fournit des sucres simples, en laboratoire, ou si elles s'associent avec un champignon qui leur fournit ces sucres (Arditti *et al*, 1990; Harrison et Arditti, 1978; Richardson *et al*, 1992). En nature, elles ne peuvent croître qu'en association avec leurs symbiotes mycorhiziens. Ces symbiotes sont constitués de différentes espèces de champignons qui aident les racines de la plante à retirer du sol les nutriments nécessaires à sa croissance normale. Le phénomène de la mycorhize est généralisé chez un grand nombre de plantes de nos forêts (Breddy, 1991; Smith et Read, 1997). Cette symbiose augmente les apports nutritifs que va chercher la plante dans le sol par ses poils absorbants (Breddy, 1991; Smith et Read, 1997). Selon Smith et Read (1997), les mycorhizes et non les racines sont les principaux agents de l'extraction des nutriments du sol par les plantes. Chez plusieurs Orchidacées, les racines n'ont qu'un petit nombre de poils absorbants, ce qui est insuffisant pour extraire et combler tous les besoins de la plante. Les champignons symbiotes assurent cette fonction, tout au moins aux stades critiques de la croissance de la plante (Breddy, 1991). Ils

pénètrent dans la graine par les micropores et les interstices entre les plaques du tégument (Clements, 1988), quoique la colonisation par l'extrémité ouverte de l'enveloppe est aussi probable (Peterson *et al*, 1998). Dans certains cas, le proembryon produit une réaction de défense et rejète le champignon. Il n'y a alors pas de croissance du proembryon et la graine ne germe pas (Hadley, 1970; Smith et Read 1997). Le champignon peut parasiter le proembryon et le détruire (Fig. 5, 6) (Hadley, 1970; Smith et Read, 1997). Un équilibre symbiotique peut s'établir entre le champignon et le proembryon et, dans ce cas, la germination de la graine peut se poursuivre normalement (Hadley, 1970; Smith et Read 1997). Chez les espèces dotées d'un suspenseur, l'entrée du champignon se fait généralement par cet organe (Burgeff, 1959; Clements, 1988). Chez le *Dactylorhiza purpurella* et chez le *D. majalis*, le champignon infecte le proembryon par les rhizoïdes de l'hôte (Rasmussen, 1990; Williamson et Hadley, 1970). Dans ce dernier cas, il y a bien infection par le suspenseur mais les hyphes ainsi introduits ne forment pas de peloton (Rasmussen, 1990). Au moins aussi longtemps que la plante ne puisse subvenir à ses besoins par photosynthèse, tous les apports énergétiques lui sont fournis par le champignon mycorhizien (Alexander et Hadley, 1985; Smith, 1966; 1967). La plante, quant à elle, ne semble pas fournir quoi que ce soit à l'endophyte (Alexander et Hadley, 1985). Chez le *S. cernua*, on trouve des graines qui n'ont pas germé malgré le contact avec le champignon. Elles n'ont pas établi la mycorhize nécessaire à leur développement. Dans d'autres cas (Fig. 10), le champignon envahit complètement le proembryon

et le détruit. Lorsque la mycorhize s'effectue, le champignon pénètre à travers le tégument ou par l'extrémité ouverte de l'enveloppe et infecte le proembryon par les cellules basales (Fig. 4, 7).

Le type de mycorhize chez les Orchidacées en général diffère beaucoup des formes de mycorhizes que l'on retrouve chez les autres plantes. Chez les Ericacées, la plante ne possède pas de poils absorbants mais des racines filiformes que le champignon infecte (Allaway et Ashford, 1996; Ashford, Allaway et Reed, 1996; Read, 1996). Il y a, dans les cellules, formation d'une masse fongique qui ressemble à un peloton mais les cellules de la plante ne survivent pas à l'infection. Après avoir servi à l'échange de nutriments avec le champignon durant un certain temps, il y a désagrégation de la cellule de la plante, suivie de la dégénérescence des hyphes. Il ne reste finalement qu'une cellule vide contenant les restes du champignon. Les cellules colonisées n'ont une durée de vie que de 5 ou 6 semaines (Smith et Read, 1997). Dans la mycorhize des Monotropacées, il y a mycorhize tri-spécifique. L'infection des Monotropacées est semblable à celle des Éricacées. Le champignon est aussi ectomycorhizien d'une plante autotrophe (Castellano et Trappe, 1985; Duddrudge et Read, 1982). Il apporte aux Monotropacées (des plantes achlorophylliennes) les nutriments qu'il retire de son symbiote chlorophyllien. Les Monotropacées sont donc des plantes épiparasites. Dans la mycorhize arbutoïde, il y a formation d'un manchon et d'un réseau de Hartig mais il y a aussi pénétration du champignon et échange de nutriments à l'intérieur des cellules épidermiques comme dans le cas de la symbiose monotropoïde

(Smith et Read, 1997). Dans la mycorhize ectomycorhizienne, le mycélium ne pénètre pas au delà de l'épiderme de la plante hôte. Il forme un manchon à la surface des racines et pénètre entre les cellules épidermiques, en formant un réseau, le réseau de Hartig. Dans le cas des mycorhizes arbusculaires, le champignon forme des structures spécialisées à l'intérieur de la racine (des arbuscules et souvent des vésicules). Ces structures demeurent vivantes et échangent des nutriments avec la plante (glucides reçus de la plante et minéraux donnés à la plante).

Chez les Orchidacées, les cellules du proembryon ne peuvent utiliser leurs réserves de lipide, faute de glyoxysome, requis pour la transformation des graisses en sucres simples dont les cellules ont besoin comme source énergétique (Harrison, 1977; Rasmussen, 1990). Seules les Orchidacées ont une mycorhize de type parasitaire du champignon, de laquelle le partenaire fongique ne semble rien retirer. Chez les Orchidacées, deux types de cellules contiennent des hyphes de champignons : des cellules hébergeantes, dans la partie extérieure du cortex du protocorme et des cellules digestives ou phagocytantes plus en profondeur (Hadley, 1975; Zelmer *et al*, 1996). Les cellules phagocytantes digèrent les pelotons et peuvent être infectées à plusieurs reprises. Le produit de cette digestion sert à alimenter la plante en formation (Fig. 25) (Peterson et Currah, 1990; Uetake *et al*, 1992). La nouvelle invasion d'une cellule se fait à partir de cellules déjà infectées. L'hyphe se rétrécit et traverse la paroi de la cellule. Lorsque l'hyphe a pénétré dans la

nouvelle cellule, elle reprend sa grosseur antérieure et y forme un nouveau peloton (Williamson et Hadley, 1970). Bien que le peloton mycorhizien soit à l'intérieur de la cellule, les hyphes ne sont pas en contact avec le cytoplasme de l'hôte (Hadley, 1982; Peterson et Currah, 1990; Richardson *et al*, 1992; Uetake *et al*, 1992; Peterson *et al*, 1996). Elles en sont séparées par une membrane ayant des caractéristiques du plasmalemme, que Peterson *et al* (1998) nomment 'périfongique', laquelle enveloppe étroitement les hyphes formant le peloton (Hadley, Johnson et John, 1971; Peterson *et al*, 1998), et dont les caractéristiques physiologiques sont peu connues (Peterson *et al*, 1998), de même que par une matrice interfaciale. Les nutriments fournis par le champignon, généralement un saprophyte capable de décomposer la matière végétale dans le sol, sont apportés à la plante par translocation. Ils doivent passer à travers la membrane plasmique et la paroi du champignon, la matrice interfaciale entre l'hôte et le champignon et la membrane de l'hôte autour du champignon (Hadley et Williamson, 1971; Peterson *et al*, 1996). Arditti *et al* (1990) citent différents auteurs ayant déterminé que les nutriments fournis incluent des sucres, des acides aminés, des vitamines, des protéines et des peptides provenant des pelotons digérés, des phosphates et probablement un grand nombre d'autres composés. Il ajoute que ces substances sont apportées aussi bien avant qu'après la lyse des hyphes. La structure enroulée en peloton assure une très grande surface pour l'absorption de ces nutriments par la plante (Peterson *et al*, 1998). À l'intérieur des cellules phagocytantes, chez le *Dactylorhiza majalis*, les

hyphes subissent des changements rapides, en même temps que le début de la mitose des cellules méristématiques (Rasmussen, 1990). Le diamètre de ces hyphes augmente de quatre à cinq fois leur grosseur normale (Clements, 1988). Ce gonflement résulte en une perte de l'intégrité des cellules fongiques dont le cytoplasme et les organelles se dispersent avant l'effondrement des parois de l'hyphes (Clements, 1988). Le dépôt qui marque les restes de parois des hyphes est probablement constitué de calose (Peterson et Currah, 1990; Peterson et al, 1998). Chez le *S. cernua*, la mycorhize se présente de façon classique pour les Orchidacées : introduction du champignon, installation possible de la mycorhize, invasion des cellules de la base, invasion de cellules à partir de cellules déjà infectées, formation de pelotons dans les cellules parenchymateuses basales hébergeantes pour les plus extérieures et digestives ou phagocytantes pour les plus profondes (Rasmussen, 1995), digestion des pelotons dans les cellules digestives et nouvelles infections de ces mêmes cellules.

Le protocorme

À la suite de l'invasion des cellules par le champignon apparaissent les premiers signes de la germination, après un temps plus ou moins long selon l'espèce. Zettler *et al* (1995) notent l'apparition et l'élongation 'extrêmement rapide' (*sic*) des rhizoïdes du *S. odorata* 10 jours après l'inoculation du proembryon. Chez le *Cypripedium acaule*, aussi bien en co-culture avec un champignon (voir chapitre 2) qu'asymbiotiquement (St-

Arnaud *et al*, 1992), il faut attendre trois mois avant de percevoir des signes de germination plus avancés que la simple augmentation de volume attribuable à l'imbibition. Le tégument se brise par l'augmentation du volume du proembryon. Le proembryon commence à se différencier, indiquant ainsi l'établissement d'une relation symbiotique (Williamson et Hadley, 1970). Par après il devient un protocorme, petit tubercule (Veyret, 1985) qui a gardé plusieurs caractéristiques embryonnaires (Ricardo et Alvarez, 1971). Ce protocorme, constitué au départ de deux types de tissus, l'un méristématique, où se confinent les activités mitotiques, au pôle chalazal, et l'autre parenchymateux, au pôle micropylaire, de même que de cellules périphériques d'où sortiront éventuellement des rhizoïdes dans les deux tiers inférieurs (Veyret, 1985). Les rhizoïdes sont de simples prolongements de la paroi de cellules épidermiques (Rasmussen, 1995). Ils ne sont constitués que d'une seule cellule très allongée. L'apparition des rhizoïdes peut précéder ou suivre le développement mitotique, selon les espèces. Chez le *Dactylorhiza majalis* les rhizoïdes commencent à se développer au onzième jour alors que les premières activités mitotiques sont visibles à partir du douzième jour (Rasmussen, 1990). Chez le *Cypripedium acaule*, l'apex commence à se structurer avant l'apparition des rhizoïdes (résultats personnels non publiés).

Parce que son développement se produit par le sommet, un jeune protocorme est souvent piriforme (Rasmussen, 1995). Le protocorme des Orchidacées est assimilable à l'embryon des dicotylédones et de la majorité des monocotylédones (Barabé et al 1993). Il serait, selon Ricardo

et Alvarez (1971), un prolongement du proembryon. La notion de protocorme a été étendue, par analogie, aux tubercules issus d'une régénération et, plus particulièrement, aux structures de reproduction végétatives situées à l'extrémité des racines du *Neottia nidus-avis* (Champagnat, 1971 ; Champagnat *et al*, 1966).

La base de la région méristématique produit de nouvelles cellules qui se différencient pour former un faisceau vasculaire. Des cellules parenchymateuses sont aussi formées. Certaines deviennent mycotrophes (Rasmussen, 1995). La relation symbiotique amène l'augmentation du volume des noyaux cellulaires des cellules mycorhizées (Rasmussen, 1995). Le phénomène est typique des cellules mycorhizées même s'il s'observe à un degré moindre dans le cas de graines germées axéniquement (Alvarez, 1968; Nagl, 1972). Cette augmentation est attribuable à une endoréplication du matériel nucléaire (Williamson, 1970; Williamson et Hadley, 1969). Une densimétrie de Feulgen démontre que les noyaux de cellules infectées contiennent 2 à 4 fois la quantité d'ADN présente dans les cellules adjacentes non mycorhizées (Williamson, 1970).

Lorsque des sucres simples sont fournis au proembryon, soit dans le milieu nutritif en situation asymbiotique, soit par le champignon compatible en situation symbiotique, de l'amidon se forme dans les cellules à partir des sucres fournis. Chez le *Cypripedium acaule*, cultivé en situation asymbiotique, l'amidon se retrouve dans toutes les cellules parenchymateuses de la base (Leroux *et al*, 1995). Chez le *S. cernua*,

cultivé en situation symbiotique, l'amidon se trouve principalement dans les cellules parenchymateuses non mycorhizées; les cellules méristématiques du sommet de même que les cellules mycorhizées n'en contiennent que peu ou pas.

La germination est très rapide chez le *S. cernua*. Les premiers signes de germination apparaissent vers le dixième jour après l'inoculation de la graine. Chez le *S. cernua*, une espèce rattachée selon Veyret (1985) au groupe des Polychondreae de Schlechter, les rhizoïdes apparaissent d'abord à la base du protocorme avant la différenciation de l'apex. L'apex commence à se structurer par la suite. La germination évolue selon le mode classique des Orchidacées. La relation symbiotique s'installe et la germination débute. Le tégument se brise par l'augmentation du volume du proembryon. Le proembryon commence à se différencier et devient un jeune protocorme piriforme. Il est constitué d'au moins deux types de tissus, le tissu méristématique, où se confinent les activités mitotiques, au pôle chalazal, et le tissu parenchymateux, au pôle micropylaire, de même que de cellules périphériques d'où sortiront éventuellement des rhizoïdes dans les deux tiers inférieurs. Le volume du noyau des cellules mycorhizées augmente. Il y a production et accumulation d'amidon, surtout dans les cellules parenchymateuses non mycorhizées. La base de la région méristématique produit de nouvelles couches de cellules parenchymateuses. Un faisceau vasculaire basipète s'installe à la base de la région méristématique et descend dans les cellules parenchymateuses. Des cellules parenchymateuses néoformées, immédiatement sous la

région méristématique, servent à accumuler les réserves d'amidon. D'autres cellules parenchymateuses deviennent mycotrophes. Les cellules mycotrophes les plus profondes sont phagocytantes, alors que celles immédiatement sous l'épiderme sont hébergeantes. Le cône qui se forme au sommet du protocorme porte le nom de proméristème, nom qui, selon Leroux *et al* (1995), a été assigné à cette structure par Rao (1967).

L'écaille

Le protocorme donnera naissance, selon les espèces, à un ou plusieurs organes foliacés que l'on nomme écaille. L'écaille est une structure foliaire mais qui ne fait pas partie du développement caulinaire. Pour certains, elle serait un cotylédon alors que pour d'autres, elle serait une feuille adventive (Barabé *et al*, 1993). Cotylédon ou feuille, c'est à l'aisselle de cette écaille que se formera l'apex caulinaire, qui constitue le véritable apex, d'où se développeront la tigelle, les structures aériennes de la plante et la racine protocormiale. Chez le *C. acaule*, l'écaille forme une entité différente de la tige qui sera produite ultérieurement (Barabé, *et al*, 1993). Toujours abortive, l'écaille ne fait pas partie du système phyllotaxique des feuilles de la tige (Champagnat *et al*, 1966). Elle forme avec le protocorme une entité morphologique correspondante au stade juvénile de la plante (Barabé *et al*, 1993). Elle croît à partir de cellules méristématiques du sommet du protocorme, différentes des cellules qui constitueront l'apex (Barabé *et al*, 1993). Elle est vascularisée par un faisceau vasculaire unique (Barabé *et al*, 1993) qui prend son origine à

partir du faisceau vasculaire initié dans le protocorme. L'écaille du *S. cernua* suit étroitement cette évolution. À partir du sommet du protocorme se forme un cône. Ce cône se développe en bourrelet puis en écaille qui entoure l'apex en formation. Elle ne fait pas partie du même système que les feuilles qui naissent de l'apex et de la tige. Elle croît directement du protocorme à partir de cellules méristématiques du sommet du protocorme, différentes de celles qui formeront l'apex. Elle est vascularisée par un faisceau vasculaire unique. À l'aisselle de cette écaille se développera l'apex d'où naissent les organes de la plante adulte.

L'apex

D'abord concave, la région délimitée par l'écaille devient convexe comme conséquence de la multiplication rapide des cellules de l'apex en voie de formation. La première feuille se développe à partir de l'apex caulinaire qui apparaît à l'aisselle de l'écaille. La deuxième feuille, de même que celles qui viendront par la suite, naissent de l'apex caulinaire. Chez le *S. cernua*, leur insertion sur la tige épouse une phyllotaxie spiralée, ce qui est conforme à la position en rosette des feuilles de la plante mature.

Les racines

La racine protocormiale apparaît dans la partie supérieure du protocorme. Cette racine, de nature exogène, est épaisse, trapue et sans ramification, ce qui est d'ailleurs le cas général de la plupart des

Orchidacées terrestres (Rasmussen, 1995). Les racines des Orchidacées sont mycorhizées en nature, mais les cellules méristématiques de même que la stèle ne sont pas infectées par le symbiote. Seule la région corticale sous-épidermique est infectée (Bredy et Black, 1954). L'extérieur de la racine porte un vélamen dont la surface est densément couverte de poils (Rasmussen, 1995). Chez le *S. cernua*, il est constitué d'une couche cellulaire unique (Pridgeon, 1987). Chez d'autres espèces, le nombre de couches cellulaires du vélamen varie et peut même atteindre 24 couches chez le *Cyrtopodium punctatum*. Il dérive de la division péricline de cellules du protoderme. Le vélamen joue un rôle dans l'assimilation des nutriments, le transport et la rétention de l'eau, dans le processus d'échanges gazeux et agit physiquement comme protection de la racine sous-jacente (Pridgeon, 1987). Sous le vélamen se trouve l'exoderme qui constitue la partie extérieure du cortex. Le cortex est séparé de la stèle par une autre couche cellulaire, l'endoderme. Au centre de la racine s'élabore la stèle, constituée du péricycle à l'extérieur et du faisceau vasculaire (xylème et phloème) (Pridgeon, 1987). Chez le *C. acaule* germé asymbiotiquement, des racines adventives apparaissent, toujours à la hauteur de la naissance d'une feuille (St-Arnaud *et al*, 1992). Il en est de même chez le *S. cernua* : de nombreuses racines adventives se développent toujours à la hauteur d'une feuille, le long de la tige. Chez les Orchidacées, comme il n'y a pas de racine primaire, toutes les racines sont adventives (Rasmussen, 1995).

En plus d'apporter les nutriments à la plante en développement, il semble que le champignon symbiote la protège contre les agents

pathogènes présents dans le sol. Anderson (1991) rapporte que seulement 2 sur 40 plants de *Spiranthes magnicamporum* germés asymbiotiquement ont survécu à la transplantation en pleine terre en milieu septique alors que 40 sur 40 plants germés en symbiose avec un champignon compatible ont survécu au transfert en pleine terre.

Chez le *S. cernua*, le champignon qui infecte le protocorme ne se développe pas jusqu'à la racine protocormiale. Dans les coupes sériées exécutées sur 3 semis porteurs d'une racine protocormiale, nous avons constaté qu'il y avait un espace occupé par des cellules non-mycorhizées entre les cellules mycorhizées du protocorme et les cellules mycorhizées de la racine. Nous n'avons pas pu trouver d'hyphe entre le protocorme et la racine. Il y aurait eu une nouvelle infection de la racine par du mycélium extérieur à la plante. Cette racine est fortement mycorhizée mais les champignons qui la mycorhizent ne semblent pas provenir du protocorme.

Chez le *S. cernua*, comme pour l'ensemble des Orchidacées, sous le vélamen se trouve le cortex constitué de l'exoderme, de cellules parenchymateuses mycorhizées ou de réserve et de l'endoderme. La stèle est constituée du péricycle à l'extérieur et du faisceau vasculaire (xylème et phloème) au centre. La stèle est en continuité avec le faisceau vasculaire de la tige.

Éléments nutritifs

Une partie de nos expériences a eu pour objet d'étudier la capacité du champignon d'apporter tous les éléments requis pour permettre à la

graine de se développer normalement. Toutes les graines placées sur milieu EAU qui ont germé avec l'aide du *C. goodyerae repentis* placé sur milieu AB ont eu un développement monstrueux. Nous en déduisons que le champignon ne peut, à lui seul, fournir tous les nutriments nécessaires pour assurer le développement harmonieux de la plante. Dans le cas des graines semées sur milieu AB, le protocorme soutirait fort probablement des éléments nutritifs du milieu ambiant. L'avoine broyée est constituée d'une graine pulvérisée qui contient une quantité substantielle d'hormones, de vitamines et de toutes sortes d'éléments dont une graine a besoin pour germer. De plus, quelques minéraux et de la matière organique étaient ajoutés au milieu. Ces éléments du milieu ont pu être absorbés par le protocorme pour assurer son développement normal.

Conclusion

Le *S. cernua* cultivé en symbiose avec son symbiote, *C. goodyerae repentis* s'est avéré un excellent sujet pour étudier le développement symbiotique des Orchidacées. Sa germination et sa croissance sont rapides. Elles épousent fidèlement la séquence de germination et de croissance que l'on connaît chez les Orchidacées. Le proembryon entre aisément en symbiose mycorhizienne avec son endophyte et ce dernier se cultive et se conserve très facilement sur gélose au PDA ou AB. Il est facile de suivre l'évolution de la graine, du protocorme et des organes qui se développent,

Même si nous avons pu suivre le déroulement de la pénétration du champignon dans la graine en développement du *S. cernua*, peu de choses sont connues sur les relations étroites qui existent entre la plante et son symbiote. Existe-t-il un système de signal entre la graine et le champignon pour que s'effectue la rencontre et que les processus symbiotiques s'enclenchent? Lorsque le champignon infecte la cellule, pourquoi forme-t-il un peloton? Quelle est le système de communication entre le champignon et la graine qui permet à cette dernière de continuer sa germination? Quels sont les nutriments ou les substances que le protocorme puise dans le milieu pour assurer son développement harmonieux? Le champignon ne retire-t-il vraiment rien de la relation symbiotique ou ne retirerait-il pas lui aussi un ou des avantages que nous n'avons pas encore compris? Il nous semble douteux qu'un organisme

comme un champignon ait fourni, depuis des millions d'années, des avantages à une plante sans s'adapter pour bénéficier lui-même de cette association. Toutes ces questions et bien d'autres encore ne pourront être élucidées qu'avec des recherches plus poussées sur le développement symbiotique et, en ce sens, le *S. cernua* peut s'avérer un outil précieux.

Bibliographie

- Alexander C. et Hadley G. (1985). "Carbon movement between host and mycorrhizal endophyte during the development of the Orchid *Goodyera repens*." New Phytologist **101**: 657 - 665.
- Allaway W. G. et Ashford A. E. (1996). "Structure of the hair roots in *Lysinema ciliatum*" R. Br. and its implications for their water relations. Annals of Botany **77**: 383 – 388.
- Alvarez M.R. (1968). "Quantitative changes in nucleus DNA accompanying postgermination embryonic development in *Vanda* (Orchidaceae)". American Journal of Botany **55**: 1036 - 1042.
- Andersen T. F. et Stalpers, J. A. (1994). "A checklist of *Rhizoctonia* epithets." Mycotaxon. **51**: 437 - 457.
- Anderson A. B. (1990). "Asymbiotic germination of seeds of some North American Orchids." North American Native Orchid propagation and production. Chadds Ford Pa. Brandywine Conservatory. 75-80.
- Anderson A. B. (1991). "Symbiotic and asymbiotic germination and growth of *Spiranthes magnicamporum* (Orchidaceae)." Lindleyana **6**: 183 - 186.
- Antlfinger A. E. (1993). "Ecology of terrestrial Orchids." American Orchid Society Bulletin (mars 1993): 280-283.
- Arditti J. (1992). "Fundamentals of Orchid biology". John Wiley & Sons. New York. 691 pages

- Arditti J., Ernst R., Yam T. W. et Glade C. (1990). "The contribution of Orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review." Lindelyana **5**: 249 - 255.
- Arditti J., Michaud J. D. et Healy P. L. (1979). "Morphology of Orchid seeds. 1. *Paphiopedilum* and native California and related species of *Cypripedium*." American Journal of Botany **66**(10): 1128 - 1139.
- Ashford A. E., Allaway W. G. et Reed M. L. (1996). "A novel role for thick-walled epidermal cells in the mycorrhizal hair roots of *Lysinema ciliatum* R. Br. and other Epacridaceae." Annals of Botany **77**: 375 - 382.
- Ballard W. B. (1987). "Sterile propagation of *Cypripedium reginae* from seeds." American Orchid Society Bulletin **56** (9 septembre 1987): 935-947.
- Ballard W. B. (1990). "Further notes on *Cypripedium* germination". North American native Orchid propagation and production conference, Chadds Ford, Pa Brandywine Conservatory. 87 - 89
- Barabé D., St-Arnaud M. et Lauzer, D. (1993). "Sur la nature des protocormes d'Orchidées (Orchidaceae)." C. R. Acad. Sci. Paris **t. 316**, (Série III,): 139-144.
- Benzing D. H. (1981). "Why is Orchidaceae so large, its seeds so small and its seedlings mycotrophic?" Selbyana **5**: 241 - 242.

- Bernard N. (1909). "L'évolution dans la symbiose: Introduction; maladie et symbiose; symbiose et évolution; les modes de développement des Orchidées; diverses conditions équivalentes à la symbiose." Annales des sciences naturelles Neuvième série(Tome IX): 1 - 196.
- Breddy N. C. (1991). "Orchid mycorrhiza and symbiotic raising technique." American Orchid Society Bulletin **60**(6): 556 - 569.
- Breddy N. C. et Black W. H. (1954). "Orchid mycorrhiza and their application to seedling raising." The Orchid Journal **3**(2): 57 - 61.
- Burgeff H. (1959). "Mycorrhiza of Orchids" (Chapter 9) . The Orchids a scientific survey. ed. W. Carl L. Withner New York, The Ronald Press Co. 361 – 395.
- Castellano M. A. et Trappe J. M. (1985). "Mycorhizal associations of five species of Monotropoideae in Oregon." Mycologia **77**: 499 - 502.
- Catling P. M. (1990). "Biology of the North American representatives of the subfamily Spiranthoideae". North American native terrestrial Orchids propagation and production, Chadds Ford , Pa. Brandywine Conservatory. 49 - 67
- Champagnat M. (1971). "Recherches sur la multiplication végétative de *Neottia nidus-avis*". Annales des sciences naturelles botaniques 12e série tome 12. Paris, Sciences naturelles de botanique: 209 - 248.

- Champagnat M., Morel G., Chaput P. et Cognet A. M. (1966) "Recherches morphologiques et histologiques sur la multiplication végétative de quelques Orchidées du genre *Cymbidium*." Revue générale de botanique **73**: 706 - 746.
- Clements M. A. (1988). "Orchid mycorrhizal association." Lindleyana **3**(2): 73 - 86.
- Clements M. A., Muir H. et Cribb P. J. (1986). "A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial Orchids." Kew Bulletin **41**(2): 437 - 445.
- Clifford H. T. et Smith W. K. (1969). "Seed morphology and classification of Orchidaceae." Phytomorphology **19**: 133 - 139.
- Cronquist A. (1981). "An integrated system of classification of flowering plants". New York, Columbia University Press. 1262 pages.
- Currah R. S. (1987). "*Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta." Canadian Journal of Botany **65**: 1957-1960.
- Currah R. S. (1991). "Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophyte of terrestrial Orchids mycorrhizae." Lindleyana **6**(4): 211 - 213.
- Currah R. S., Abbott S. P. et Sigler L. (1996). "*Arthroderma silverae* sp. nov. and *Chrysosporum vallenarense*, keratinophilic fungi from arctic and montane habitats." Mycological Research **100**(2) : 195-198.

- Currah R. S., Hambleton S. et Smreciu A. (1988). "Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*." American Journal of Botany **75**(5): 739 - 752.
- Currah R. S., Sigler L. et Hambleton S. (1987). "New records and new taxa of fungi from the mycorrhizae of terrestrial Orchids of Alberta." Canadian Journal of Botany **65**: 2473-2482.
- Currah R. S., Smreciu E. A. et Hambleton, S. (1990). "Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae)." Canadian Journal of Botany **68**: 1171 - 1181.
- Currah R. S. et Zelmer C. (1992). "A key and notes for the genera of fungi mycorrhizal with Orchids and a new species in the genus *Epulorhiza*." Reports of the Tottori Mycological Institute **30** : 43-59.
- Currah R. S., Zelmer C. D., Hambleton S. et Richardson K. A. (1997). Fungi from Orchid mycorrhiza. Orchid biology: Review and perspectives. Londre, ed. J. Arditti. Kluwer Academics Publishers. **7**: 171 - 212.
- Currah R. S., Zettler L. W. et Mcinnis T. M. (1997). "*Epulorhiza inquilina* sp. nov. from *Platanthera* (Orchidaceae) and a key to *Epulorhiza* Species." Mycotaxon **61**: 335 - 342.
- Curtis J. T. (1936). "The germination of native Orchid seeds." The American Orchid Society Bulletin (Decembre): 42 - 47.
- Dressler R. L. (1981) "The orchid - Natural history and classification". Cambridge. Mass. Harvard University Press. 332 pages.

- Duddrudge J. A. et Read D. J. (1982). "An ultrastructure analysis of the development of mycorrhizas in *Monotropia hypopitys*. L." New Phytologist **92**: 203 - 214.
- Garay L. A., (1960). On the origin of the Orchidaceae. Cambridge, Botanical Museum of Harvard University: **rapport No. 19** : 57 - 96.
- Hadley G. (1970). "Non-specificity of symbiotic infection in Orchid mycorrhiza." New Phytologist **69**: 1015-1023.
- Hadley G. (1975). Organisation and fine structure of Orchid mycorrhiza. Endomycorrhizas. ed. F. E. Sanders B. Mosse P. B. Tinker. London, Academic Press. 335 – 351.
- Hadley G., (1982). Orchid mycorrhiza. Orchid biology: Review and perspective II. ed. J. Arditti. Ithaca, Cornell University Press. 84 – 118.
- Hadley G., Johnson R. P. C. et John D. A. (1971). "Fine structure of the host-fungus Interface in Orchid mycorrhiza." Planta **100**: 191-199.
- Hadley G. et Williamson B. (1971). " Analysis of the post-infection growth stimulus in Orchid mycorrhiza." New Phytologist **70**: 445-455.
- Harrison C. R. (1977). "Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae)." Botanical Gazette **138 (1)**: 41-45.
- Harrison C. R. et Arditti J. (1978). "Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae)." Botanical Gazette **139 (2)**: 180 - 189.

- Leake J. R. (1994). "The biology of myco-heterotrophic ("saprophytic") plants." New Phytologist **127** : 171 - 216.
- Leroux G., Barabé D. et Vieth J. (1995). "Morphogénèse comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre." Canadian Journal of Botany **73**: 1391 - 1406.
- Leroux G., Barabé D. et Vieth J. (1997). "Morphogenesis of the protocorm of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae)." Plant Systematic and Evolution. **205** : 53 - 72.
- Maas P. J. M. et Ruyters P. (1986). "*Voyria and Voyriella* (Saprophytic Gentianaceae) " ed. Organisation for Flora Neotropica. New York, New York Botanical Garden. p. 1 – 93.
- Manning J. C. et van Standen J. (1987). "The development and mobilisation of seed reserve in some African Orchids." American Journal of Botany **35**: 343 - 353.
- Marchisio V. F., Berta G., Fontana A. et Mannina F. M. (1985). "Endophytes of wild Orchids native to Italy: Their morphology, caryology, ultrastructures and cytochemical characterisation." New Phytologist **100**: 623 - 641.
- Marie-Victorin F. (1995). "La flore Laurentienne". 3^e édition. Montréal. Les Presses de l'université de Montréal. 1083 pages.
- Masuhara G. et Katsuya K. (1989). "Effects of mycorrhizal fungi on seed germination and early growth of three Japanese terrestrial Orchids." Scientia horticultrae **37**(4): 331 - 337.

- Masuhara G. et Katsuya K. (1994). "In situ and in vitro specificity between *Rhizoctonia* spp. and *Spiranthes sinensis* (Persoon) Ames. var. *amoena* (M. Bieberstein) Hara (Orchidaceae)." New Phytologist **127**: 711-718.
- Moore R. T. (1987). "The genera of *Rhizoctonia*-like fungi *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* sp. nov., *Epulorhiza* sp. nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*." Mycotaxon **29**: 91 - 99.
- Nagl W. (1972). "Evidence of DNA amplification in the Orchid *Cymbidium* in vitro." Cytobios **5**: 145 - 154.
- O'Brien T. P. et McCully M. E. (1981). "The study of plant structures: principles and selected methods". Melbourne. Termacarphi PTY Ltd. 340 pages.
- Oliva A. P. et Arditti J. (1984). "Seed germination of North American Orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium*, and *Spiranthes*." Botanical Gazette **145**(4): 495-501.
- Peterson R. L., Bonfante P., Faccio A. et Uetake Y. (1996). "The interface between fungal hyphae and Orchid protocorm cells." Canadian Journal of Botany **74**: 1861-1870.
- Peterson R. L. et Currah R. S. (1990). "Synthesis of mycorrhizae between protocorms of *Goodyera repens* (Orchidaceae) and *Ceratobasidium cereale*." Canadian Journal of Botany **68**: 1117-1125.
- Peterson R. L., Uetake Y. et Zelmer, C. (1998). "Fungal symbioses with Orchid protocorms." Symbiosis **25**: 29 - 55.

- Pridgeon A. (1987). "The velamen and exodermis of Orchid roots".
Orchid biology: reviews and perspectives. ed. A. Arditti, Cornell University Press. **4**: 139 - 192.
- Ramsay R. R., Sivasithamparam K. et Dixon K. W. (1987). "Anastomosis groups among *Rhizoctonia*-like endophytic fungi in South Western Australian *Pterostylis* species (Orchidaceae)." Lindleyana **2**: 161 - 166.
- Rasmussen H. N. (1990). "Cell differentiation and mycorrhizal infection in *Dactylorhiza majalis* (Rchb. f.) Hunt & Summerh. (Orchidaceae) during germination *in vitro*." New Phytologist **116**: 137-147.
- Rasmussen H. N. (1995). Terrestrial Orchids : from seed to mycotrophic plant. Cambridge, Cambridge University Press. 440 pages.
- Rasmussen H. N. et Whigham D. F. (1993). "Seed ecology of dust seeds *in situ*: a new study technique and its application in terrestrial Orchids." American Journal of Botany **80**(12): 1374 - 1378.
- Read D. J. (1996). "The structure and function of the ericoid mycorrhizal root." Annals of Botany **77**: 365 - 376.
- Ricardo M. J. et Alvarez, M. R. (1971). "Ultrastructural changes associated with utilisation of metabolite reserves and trichome differentiation in the protocorm of *Vanda*." American Journal of Botany **58**: 229 - 238.

- Richardson K. A., Peterson R. L. et Currah R. S. (1992). "Seed reserve
And early symbiotic protocorm development of *Platanthera
hyperborea* (Orchidaceae)." Canadian Journal of Botany **70**(291 -
300).
- Schmidt J. M. et Antlfinger A. E. (1992). "The level of agamosperny in
a Nebraska population of *Spiranthes cernua* (Orchidaceae)." American Journal of Botany **79**: 501 - 507.
- Smith S. E. (1966). "Physiology and Ecology of Orchid Mycorrhizal
fungi with reference to seedling nutrition." Orchid Mycorrhizal Fungi.
Cambridge University. Cambridge 488 pages.
- Smith S. E. (1967). "Carbohydrate Translocation in Orchid Mycorrhizas." New Phytologist **66**: 371-378.
- Smith S. et Read D. J. (1997). Mycorrhizal symbiosis. London, U. K.,
Academic Press. Harcourt Brace & Co. 605 pages.
- Smreciu E. A. et Currah R. S. (1989). "Symbiotic germination of seeds of
terrestrial Orchids of North America and Europe." Lindleyana **1**: 6-
15.
- Sokolski K., Dovholuk A., Dovholuk L., Lavigne K., Ganey K. et Faletra
P. (1997). "Histological and developmental studies of the showy
lady's slipper *Cypripedium reginae*." North American Orchid Journal
3(2 june 1997): 198 - 214.

- Souèges R. (1936). Exposés d'embryologie et de morphologie végétale. VII. La différenciation. Deuxième fascicule III. La différenciation organique. Actualités scientifiques et industrielles, No 381. Paris, Librairie scientifique Hermann et cie. 375 – 381.
- St-Arnaud M., Lauzer D. et Barabé D. (1992). "In vitro germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae)." Lindleyana **71**(1): 22-27.
- Stoutamire W. (1964). "Seeds and seedlings of native Orchids." Michigan Botanist **3** : 107 - 109.
- Stoutamire W. (1974). "Terrestrial Orchid seedlings." ed. C. L. Withner, New York, The Orchid : scientific studies. John Wiley & Sons. 101 - 128
- Swamy B. G. L. (1949a). "Embryological studies in the Orchidaceae I. Gametophytes." The American Midland Naturalist: 184 - 202.
- Swamy B. G. L. (1949 b). "Embryological studies in the Orchidaceae II. Embryogeny." The American Midland Naturalist: 202 - 232.
- Taylor L. et Bruns T. D. (1996). "Myco-heterotrophy in Northern American Orchids : specificity and trophic links". First international conference on mycorrhizae, University of California, Berkeley. 117.
- Terashita T. et Chuman S. (1987). "Fungi inhabiting wild Orchids in Japan IV. *Armillaria tubescens*, a new symbiont of *Galeola septentrionalis*." Transactions of the Mycological Society of Japan **28**: 145 - 154.

- Uetake Y., Kobayashi K. et Ogoshi A. (1992). "Ultrastructural changes during the symbiotic development of *Spiranthes sinensis* (Orchidaceae) protocorms associated with binucleate *Rhizoctonia* anastomosis group C". *Mycological Research* **96**(3): 199-209.
- Umata H. (1995). "Seed germination of *Galeola altissima*, an achlorophyllous Orchid with aphyllophorate fungi." *Mycoscience* **36**: 369 - 372.
- Veyret Y. (1985). "Development of the embryo and the young seedling stages of Orchids". *The Orchid scientific studies*. ed. C. L. Withner. Malabar, Fla., Krieger Publishing Co.: 223 - 265.
- Warcup J. H. (1966). "Perfect state of some *Rhizoctonias*." *Transactions British Mycological Society*. **49**(3): 427 - 435.
- Warcup J. H. (1967). "Perfect states of *Rhizoctonia* associated with Orchids I." *New Phytologist*. **66**: 631 - 641.
- Warcup J. H. (1985). "*Rhizanthella gardneri* (Orchidaceae), its *Rhizoctonia* endophyte and close association with *Melaleuca uncinata* (Myrtaceae) in Western Australia." *New Phytologist* **99**: 273 - 280.
- Warcup J. H. (1988). "Mycorrhizal association of isolates of *Sebacina vermifera*." *New Phytologist* **110**: 227 - 231.
- Warcup J. H. (1991). "The *Rhizoctonia* endophytes of *Rhizanthella* (Orchidaceae)." *Mycological Research* **95**(6): 656 - 659.
- Warcup J. H. et Talbot, P. H. B. (1962). "Ecology and identity of mycelia isolated from soil." *Transactions British Mycological Society*. **45**(4): 495 - 518.

- Williamson B. (1970). "Induced DNA synthesis in Orchid mycorrhiza." Planta **92**: 347- 354.
- Williamson B. et Hadley G. (1969). "DNA content of nuclei in Orchid protocorms symbiotically infected with *Rhizoctonia*." Nature **222**: 582 - 583.
- Williamson B. et Hadley G. (1970). "Penetration and infection of Orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates." Phytopathology. **60**: 1092 - 1096.
- Yeung E.C. et Law S. K. (1992). "Embryology of *Calypso bulbosa*.II. Embryo Development." Canadian Journal of Botany **70**: 461-468.
- Yoshikazu H., Katsuhiko K. et Suuichi H. (1994). "*In vitro* seed germination of four asiatic taxa of *Cypripedium* and notes on the nodal micropropagation of American *Cypripedium montanum*." Lindleyana **9**: 93-97.
- Zelmer C. D. et Currah R. S. (1995). "Evidence for a fungal liaison between *Corallorhiza trifida* (Orchidaceae) and *Pinus contorta* (Pinaceae)". Canadian Journal of Botany **73**: 862 - 866.
- Zelmer C. D. et Currah R. S. (1997). "Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occurring endophyte." Lindleyana **12**(3): 142-148.
- Zelmer C. D., Cuthbertson L. et Currah R. S. (1996). "Fungi associated with terrestrial Orchid mycorrhizas, seeds and protocorms." Mycoscience **37**: 439 - 448.

- Zettler L.W. (1997). "Sensitivity of *Spiranthes odorata* seeds to light during *in vitro* seed germination." Lindleyana **12**(1): 26 - 29.
- Zettler L. W. (1998). "Orchid conservation in the 21st century : The value of including mycorrhizal fungi to preserve endangered species." North American Native Orchid Journal. **4**(3): 261 - 269.
- Zettler L. W., Barrington F. V. et McInnis T. M. (1995). "Developmental morphology of *Spiranthes odorata* seedlings in symbiotic culture." Lindleyana **10**(3): 211 – 216.
- Zettler L. W et McInnis T. M. (1992). "Propagation of *Platanthera integrilabia* (Croorell) Luer, an endangered terrestrial Orchid through symbiotic seed germination." Lindleyana **7**(3): 154 - 161.
- Zettler L. W. et McInnis T. M. (1993). "Symbiotic seed germination and development of *Spiranthes cernua* and *Goodyera pubescens*(Orchidaceae: Spiranthoideae)." Lindleyana **8**(3): 155-162.

Fig. 1. Graine du *S. cernua* en transparence dans son tégument réticulé avec son proembryon. Fig. 2. Coupe longitudinale d'une graine du *S. cernua* avec son tégument constitué d'une mince enveloppe et son proembryon avec les grosses cellules parenchymateuses de sa base et les petites cellules méristématiques de son sommet. Fig. 3. Graine complète du *S. cernua* vue au MEB; À noter le tégument réticulé. Fig. 4. Coupe de graine du *S. cernua* contenant deux proembryons. (polyembryonie). Échelle : 100 μm . Ac, cellules du pôle antérieur. Cn, noyau cellulaire; Pc, cellules du pôle postérieur; Pre, Proembryon; Sc, tégument ; Vac, vacuole.

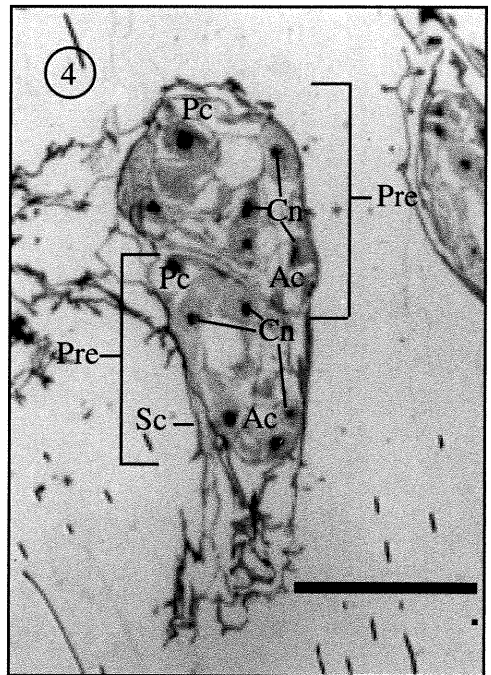
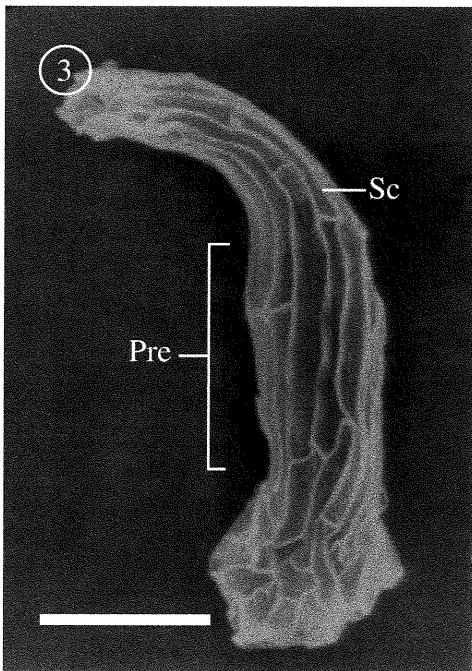
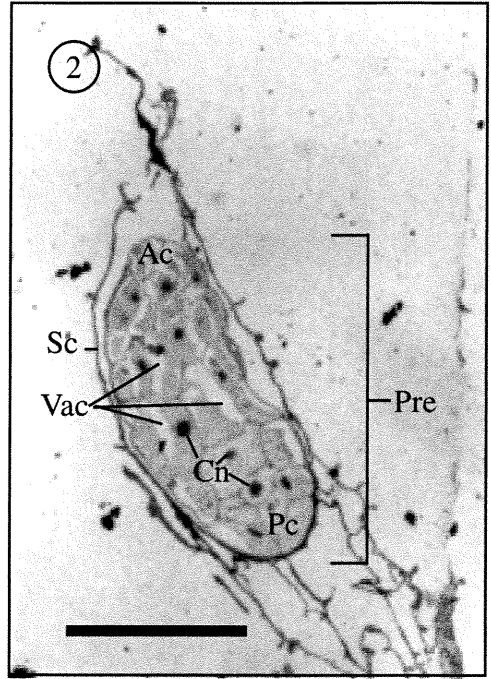
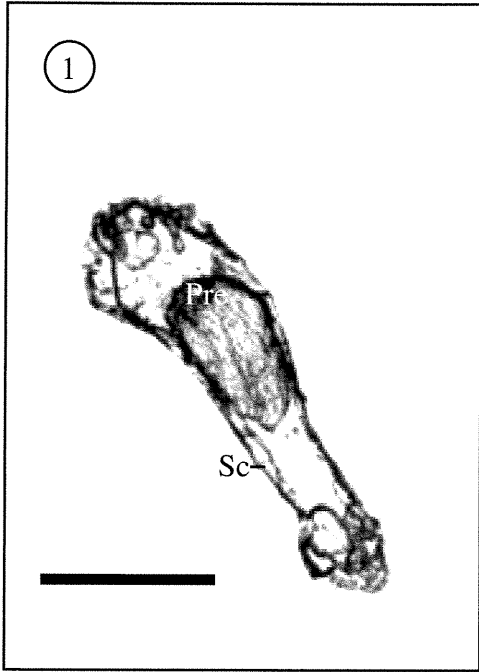


Fig. 5. Le *C. goodyerae repentis* atteignant la graine du *S. cernua*. Échelle : 100 μm . Fig. 6. Le *C. goodyerae repentis* a pénétré par la base et a commencé à infecter les cellules de la base du *S. cernua* . Échelle = 100 μm . Fig. 7. Graine du *S. cernua* dont le proembryon, toujours dans son tégument, montre une mycorhize normale avec le *C. goodyerae repentis*. Échelle = 50 μm . Fig. 8. Détails de pelotons et d'hyphes du *C. goodyerae repentis* digérées, avec une nouvelle infection dans la même cellule, dans un proembryon du *S. cernua* au début de la mycorhize. Échelle = 50 μm . Dh, hyphes digérés; Hy, hyphes; My, mycélium; Ni, Nouvelle infection; Pc, cellules du pôle postérieur; Pe, pelotons; Sc, tégument;

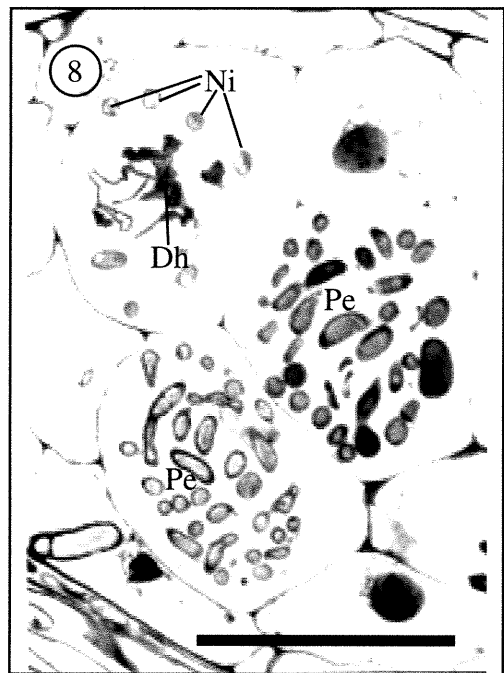
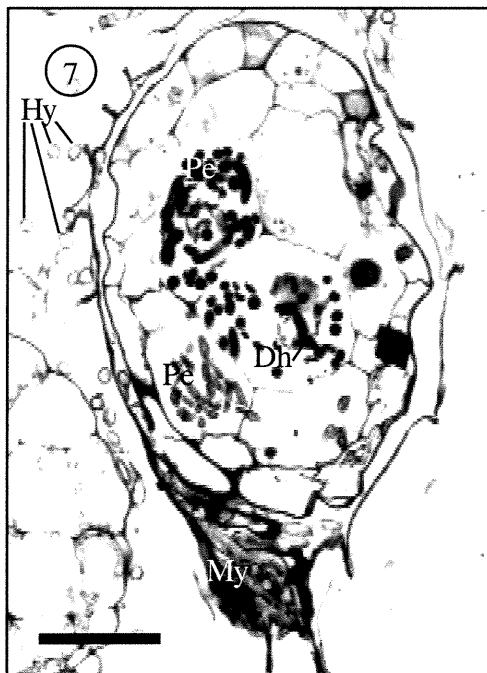
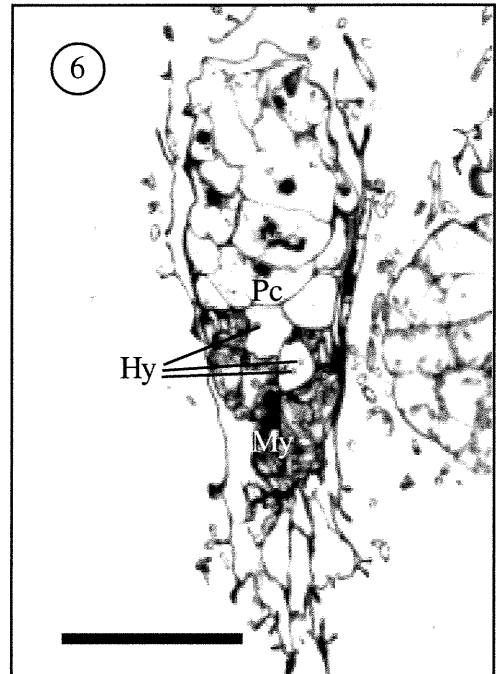
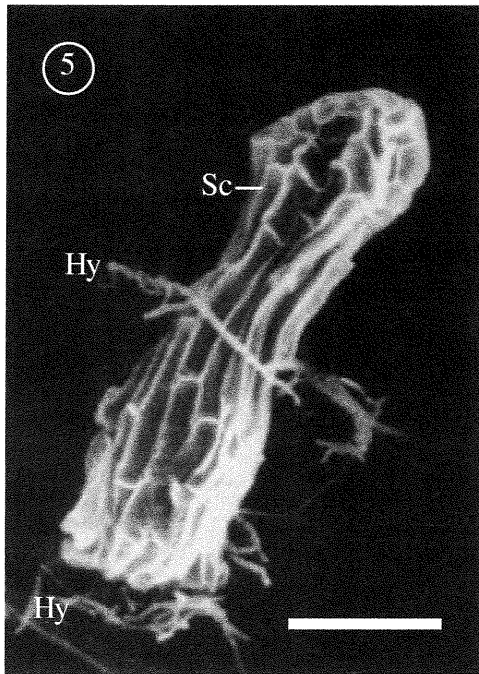


Fig. 9. Hyphe du *C. goodyerae repentis* traversant la paroi d'une cellule du *S. cernua* pour infecter une cellule voisine. Échelle = 50 μ m. Fig. 10. Proembryon du *S. cernua* envahi par le *C. goodyerae repentis*. Échelle = 100 μ m. Fig. 11. Protoderme à la surface d'un protocorme du *S. cernua*. Échelle = 50 μ m. Fig. 12. Naissance d'un rhizoïde à la surface d'un protocorme du *S. cernua*. Échelle : 10 μ m. Htw hyphe traversant la paroi cellulaire. Inv, proembryon envahi par le champignon; Prd, protoderme. Rh, rhizoïdes.

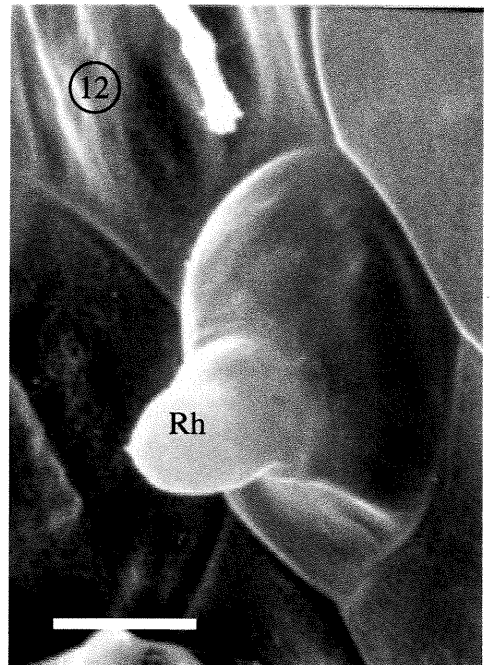
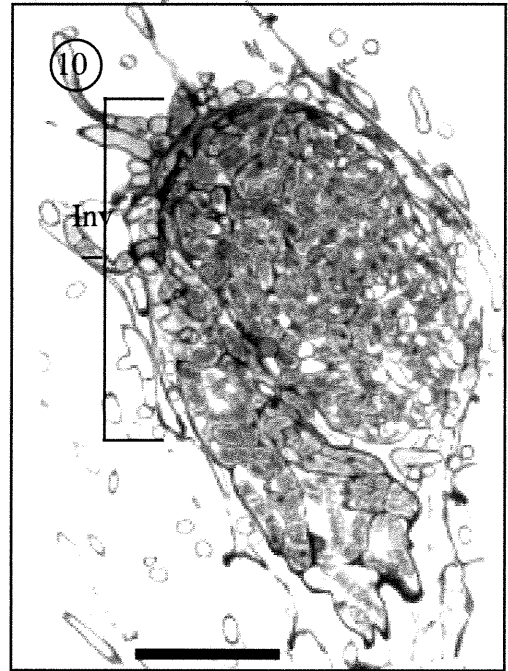
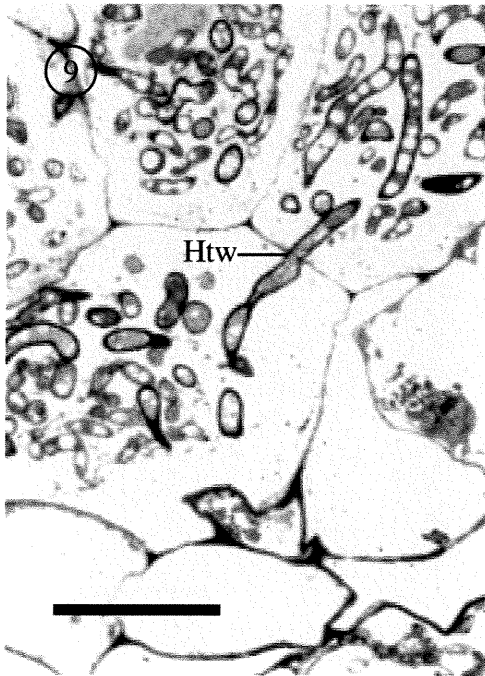


Fig. 13. Coupe longitudinale d'un rhizoïde du *S. cernua*, constitué d'une seule cellule, mycorhizé avec le *C. goodyerae repentis*. Échelle : 50 μm .

Fig. 14. Hyphes en spirale du *C. goodyerae repentis* à l'intérieur d'un rhizoïde du *S. cernua*. Échelle: 100 μm .

Fig. 15. Tout début du développement du protocorme du *S. cernua* mycorhizé par le *C. goodyerae repentis*; Le développement des cellules du pôle antérieur donne un aspect piriforme au protocorme; Les cellules externes se multiplient surtout par division péricline. Échelle : 50 μm .

Fig. 16. Formation du dôme de la partie antérieure du *S. cernua*; le protocorme est encore en partie dans son tégument; Échelle 100 μm . Ac, cellules du pôle antérieur; Df, forme de dôme; Hy, hyphe; Pc, cellules du pôle postérieur; Pdc, cellules du protoderme; Ped, divisions périclines; Psp, protocorme piriforme; Rh, rhizoïde; Sc, tégument; Sh hyphes en spirale.

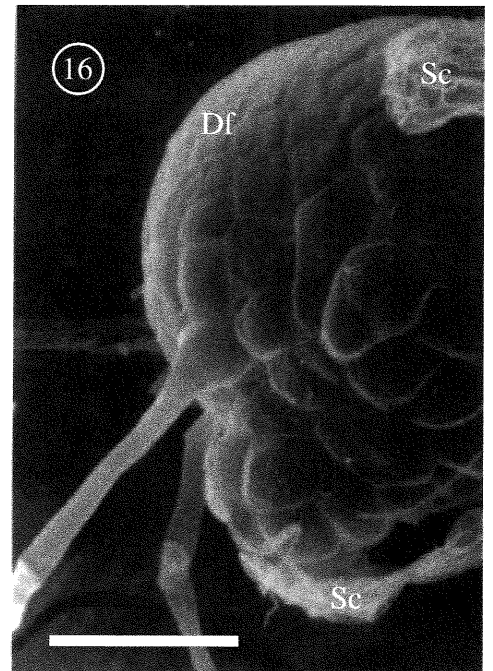
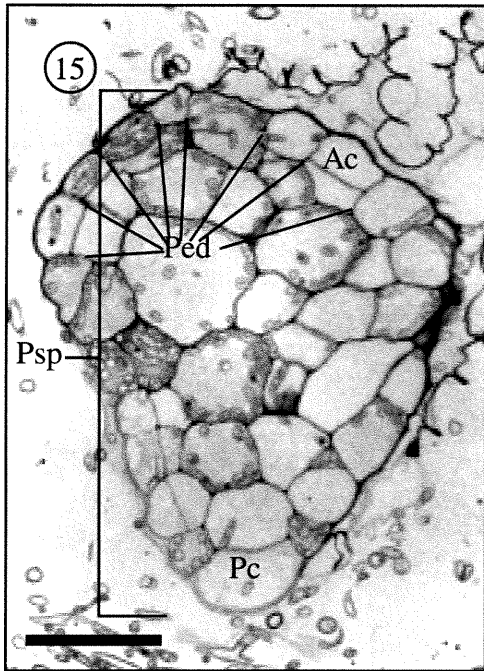
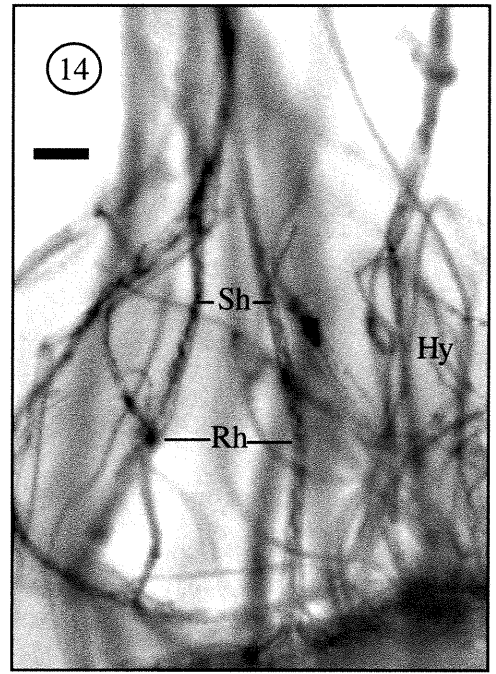
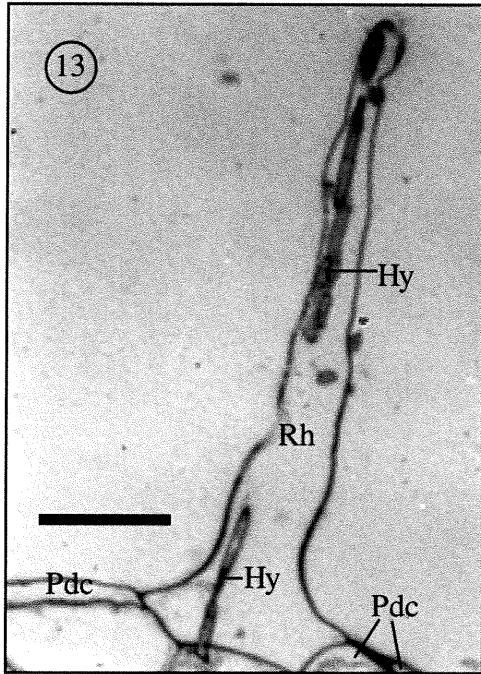


Fig. 17. Apex du *S. cernua* constitué de cellules relativement petites; Des cellules néoformées sont mycorhizées par le *C. goodyerae repentis*; De grosses cellules parenchymateuses sont formées à la base. Échelle : 50 μm . Fig. 18. Le protocorme du *S. cernua* est complètement libéré du tégument; Le dôme apical s'est aplati et est maintenant plus large que long. Échelle : 100 μm . Fig. 19. Les pôles antérieur et postérieurs du *S. cernua* sont de plus en plus évidents; Les cellules de l'apex ont tendances à former des files longitudinales. Échelle : 100 μm . Fig 20. Le développement des cellules de la base et de l'apex redonne au protocorme du *S. cernua* une forme obovoïde. Échelle : 200 μm . Ac, cellules du pôle antérieur; Ape, apex; Fad, dome apical aplati; Nic, cellules néoformées mycorhizées; Npc Cellules parenchymateuses néoformées; Pc, cellules du pôle postérieur; Rfc, cellules en files radiales; Sc, tégument

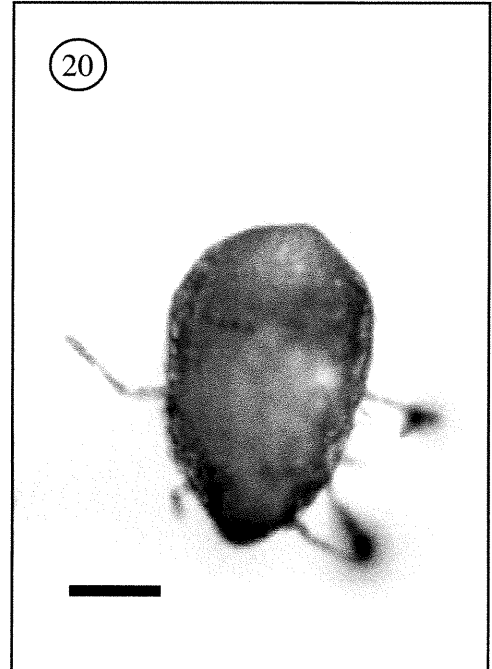
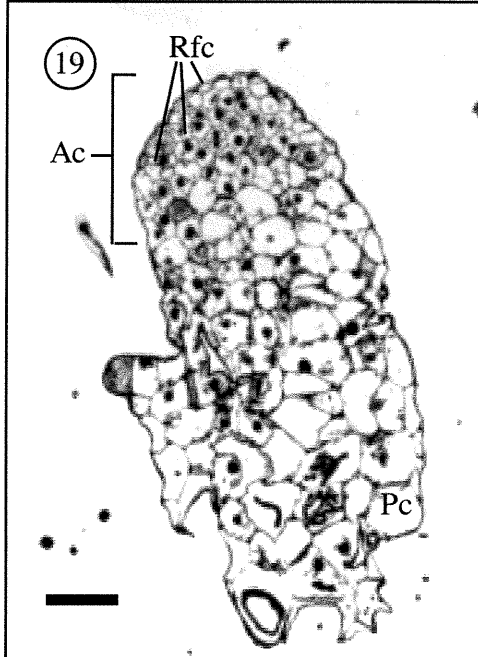
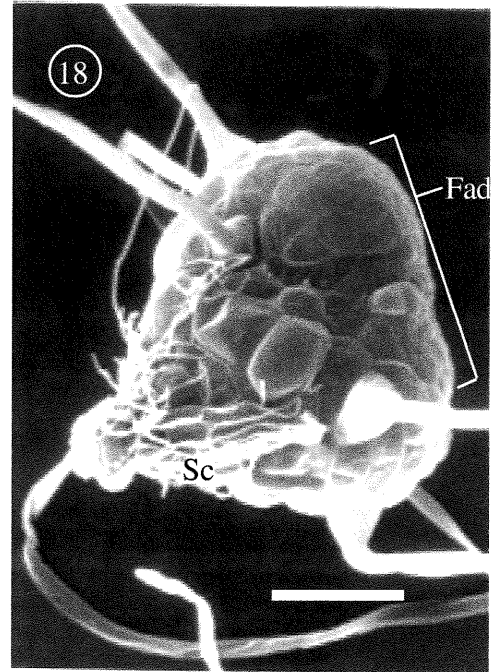
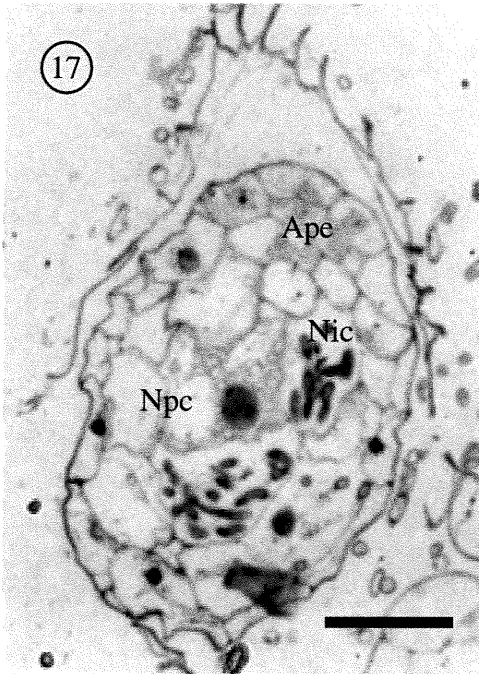


Fig. 21. A cause du développement des cellules de la base de la région méristématique et de dôme apical, le protocorme du *S. cernua* reprend une forme obovoïde; La couche superficielle de cellules forme un épiderme autour du protocorme. Fig. 22. Dimension des cellules et des noyaux de cellules du *S. cernua* mycorhizées par le *C. goodyerae repentis*. Fig.23. Dimension des cellules et des noyaux de cellules non-mycorhizées du *S. cernua*. Fig. 24. Amidon, surtout dans les cellules parenchymateuses du *S. cernua*. Ech. 50 μm . Cn, noyaux cellulaires; Ec, cellules épidermiques; Lpc, grosses cellules parenchymateuses; Sac, petites cellules apicales; St, amidon.

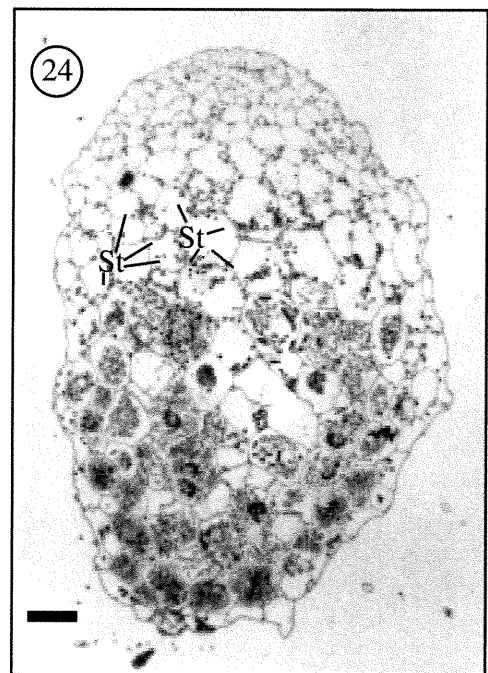
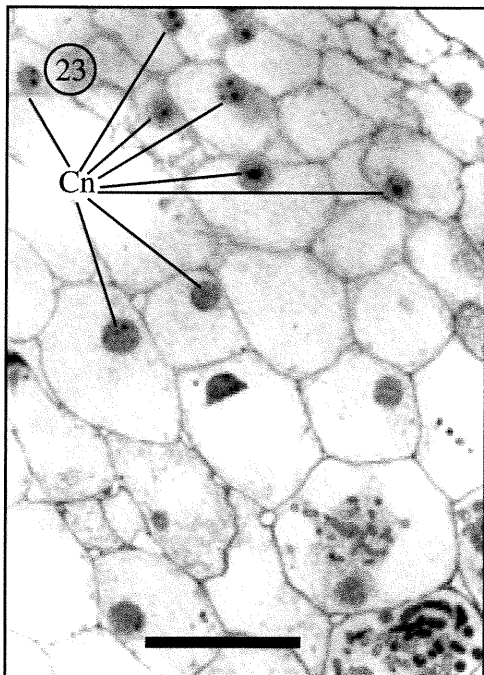
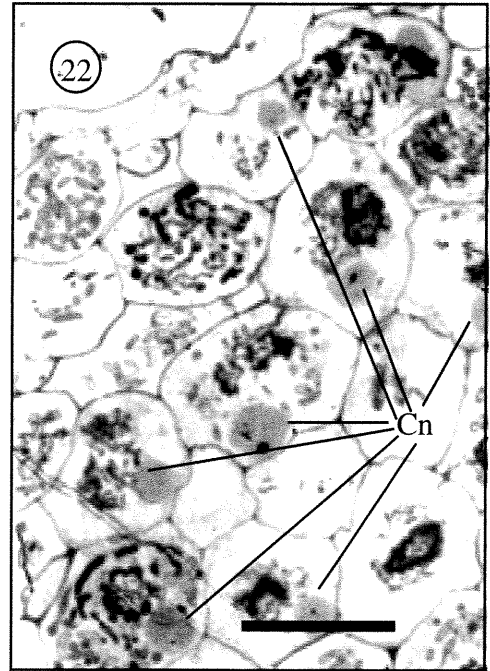
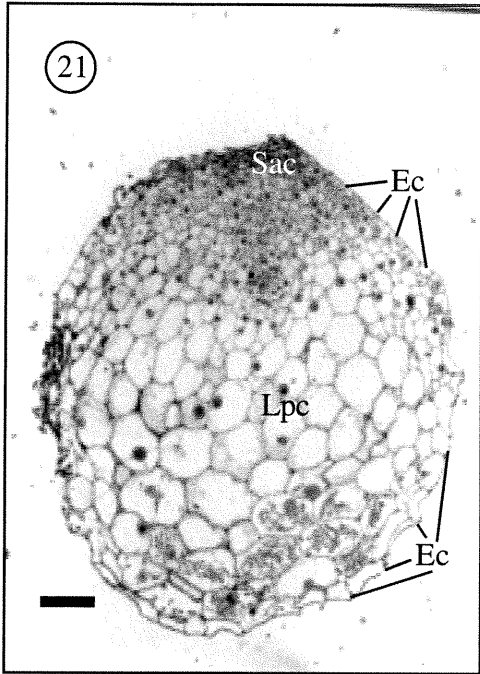


Fig. 25. Cellules hébergeantes et cellules digestives du *S. cernua* contenant des hyphes du *C. goodyerae repentis*. Échelle 50 μm . Fig. 26. Protocorme complet du *S. cernua* laissant voir des pelotons du *C. goodyerae repentis* par transparence. Échelle 200 μm . Fig. 27. Bouton apical du *S. cernua*, initiateur des structures à venir Échelle 50 μm . Fig. 28. Protocorme complet du *S. cernua* montrant la forme conique que prend l'apex. Échelle 500 μm . Ab, bouton apical; Cad, Dome apical conique; Dc, cellules digestives; Hc, cellules hébergeantes; Pe, pelotons; Rh, rhizoïdes.

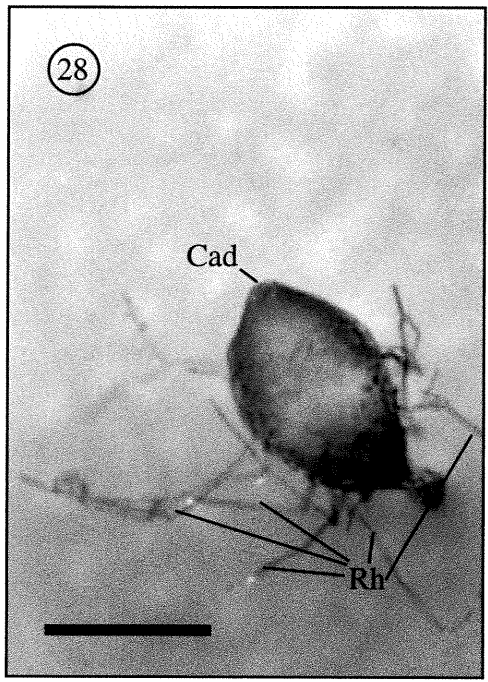
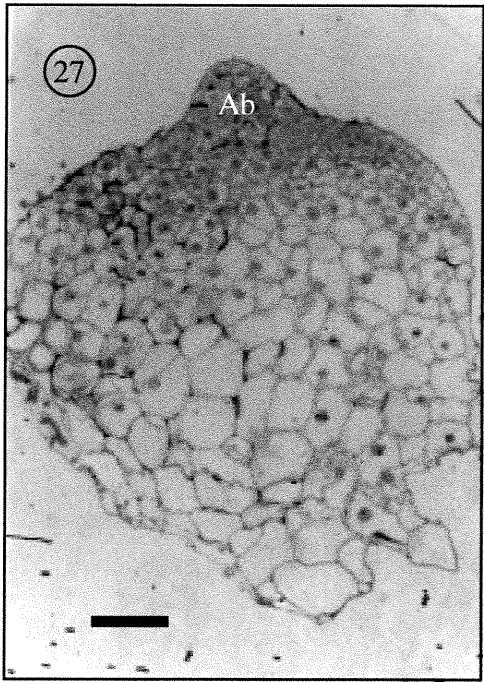
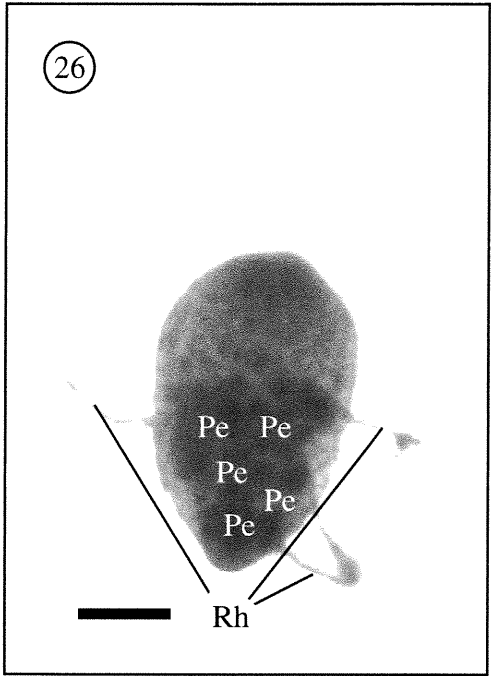
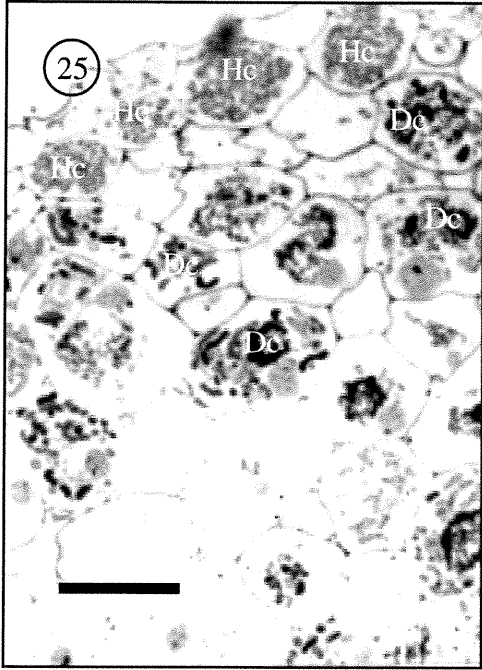


Fig. 29. Formation du procambium du *S. cernua*. Échelle = 50 μ m. Fig. 30. Invagination qui délimitera le futur apex du *S. cernua* au sommet du proméristème. De cet apex naîtront toutes les structures de la plante. Échelle = 100 μ m. Fig. 31. Bourrelet délimitant l'apex du *S. cernua*; De ce bourrelet naîtra l'écaille. Échelle = 50 μ m. Fig. 32. Détails de l'écaille naissante du *S. cernua*. Échelle : 50 μ m. Apr, bourrelet apical; Flo, écaille; Ivg, invagination; Pcb, procambium; Prm, proméristème.

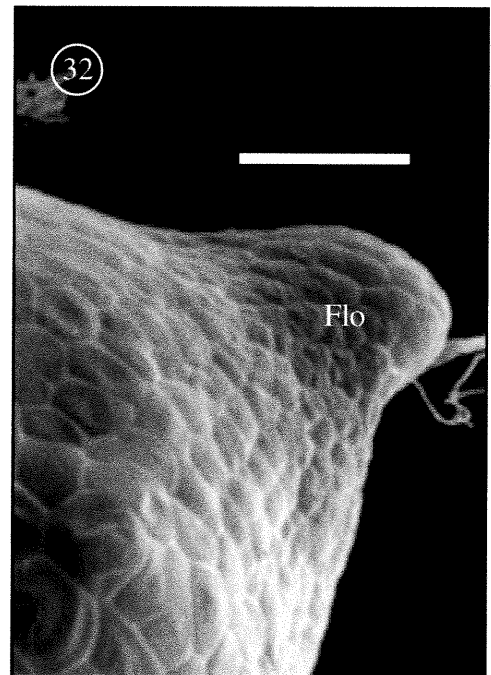
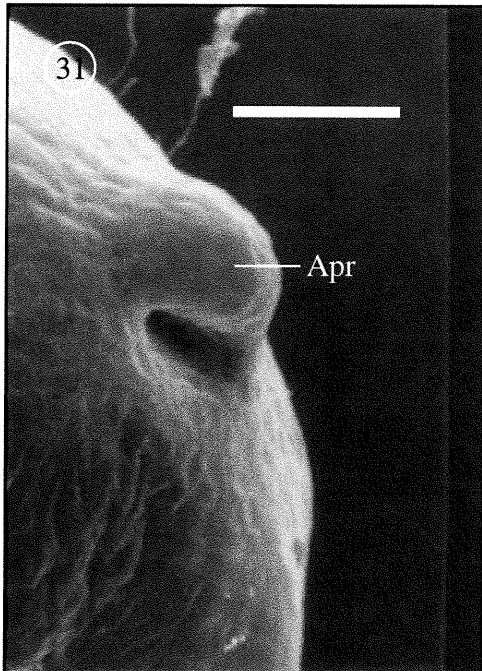
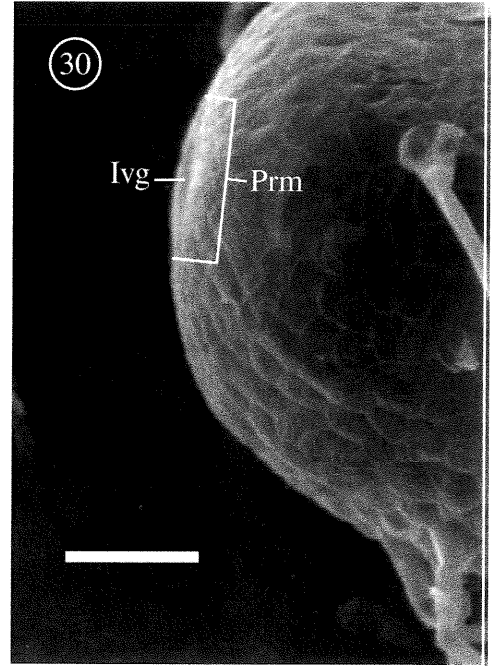
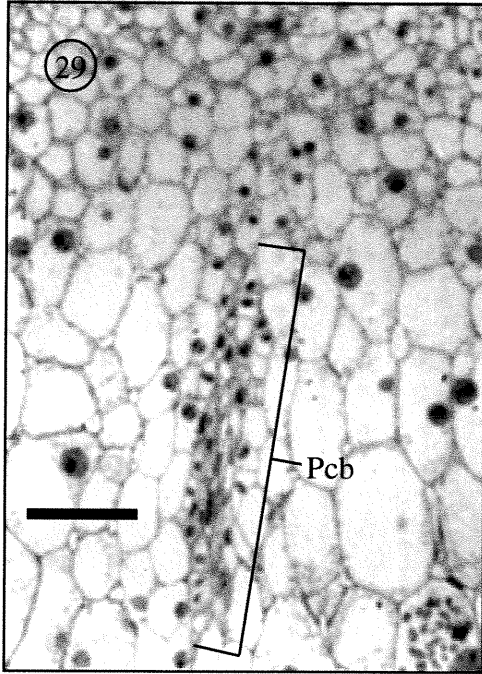


Fig. 33. Coupe montrant l'origine protocormiale de l'écaille du *S. cernua*. Échelle, 100 μm . Fig. 34. Coupe montrant la position du faisceau vasculaire qui s'est formé dans l'écaille du *S. cernua*. Échelle, 100 μm . Fig. 35. Détails de la structure du faisceau vasculaire du *S. cernua*. Échelle, 50 μm . Fig. 36 Détails d'une cellule du faisceau vasculaire du *S. cernua*. Échelle, 25 μm . Ape, apex; Flo, écaille; Prc, protocorme; Vb, faisceau vasculaire; Vbc, cellule du faisceau vasculaire.

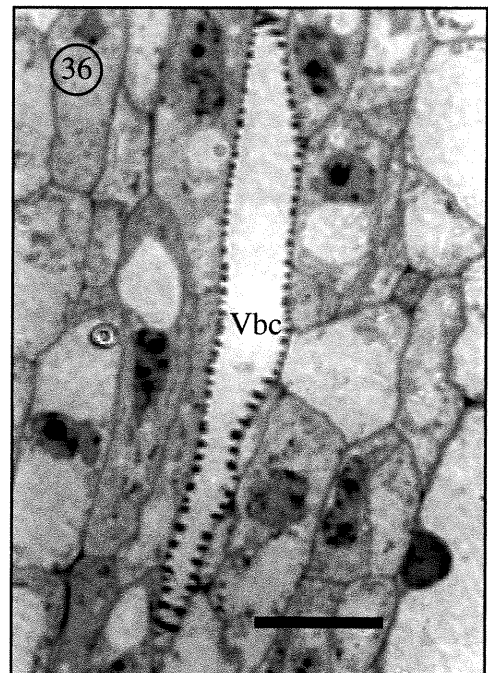
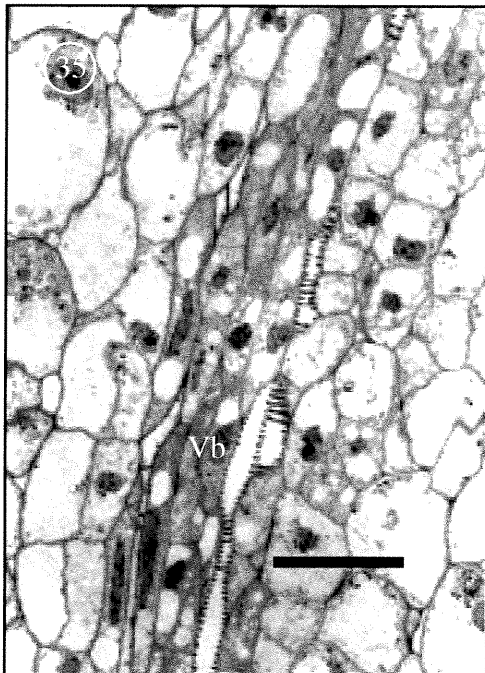
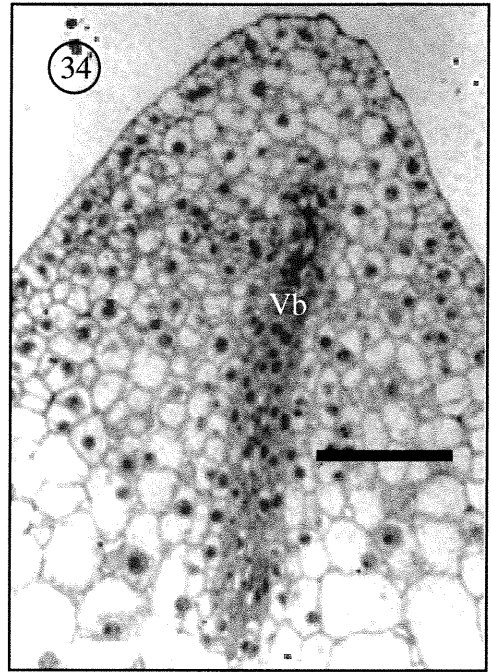
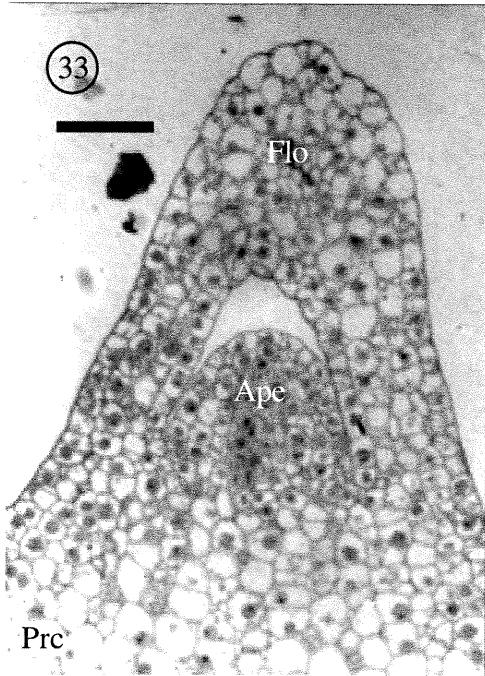
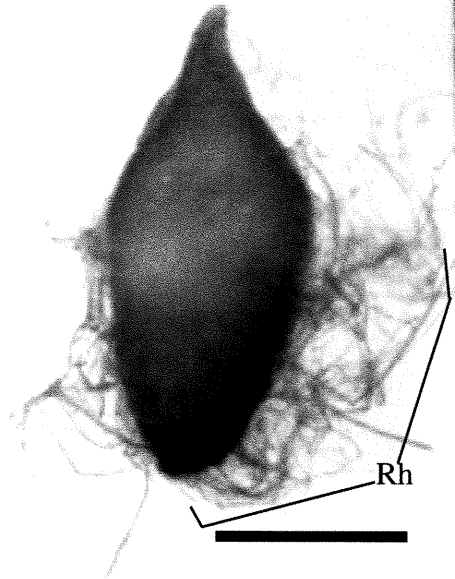
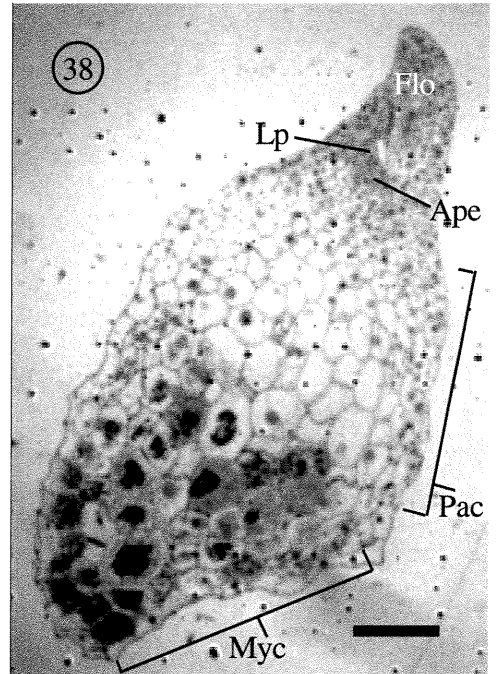


Fig. 37. Protocorme complet du *S. cernua* au début de l'initiation de l'écaïlle. À noter les nombreux rhizoides. Échelle, 1mm. Fig. 38. Coupe d'un protocorme complet du *S. cernua* au stade début de la formation de l'apex et du primordium foliaire. Échelle, 200 μm . Fig. 39. Coupe transversale de l'écaïlle du *S. cernua* montrant l'épiderme, le mésophylle et le faisceau vasculaire. Échelle, 100 μm . Fig. 40 Détails de la partie antérieure d'un protocorme du *S. cernua* au stade début de la formation de l'apex et du primordium foliaire. Échelle, 100 μm . Ape , apex; Ec cellules épidermiques; Flo, écaïlle; Lp, primordium foliaire; Mes, mésophylle; Myc, cellules mycorhizées; Pac, cellules parenchymateuses; Rh, rhizoides; Vb, faisceau vasculaire.

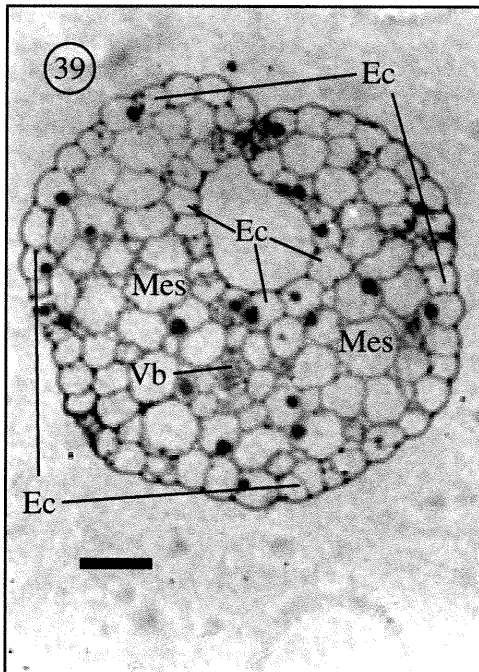
37



38



39



40

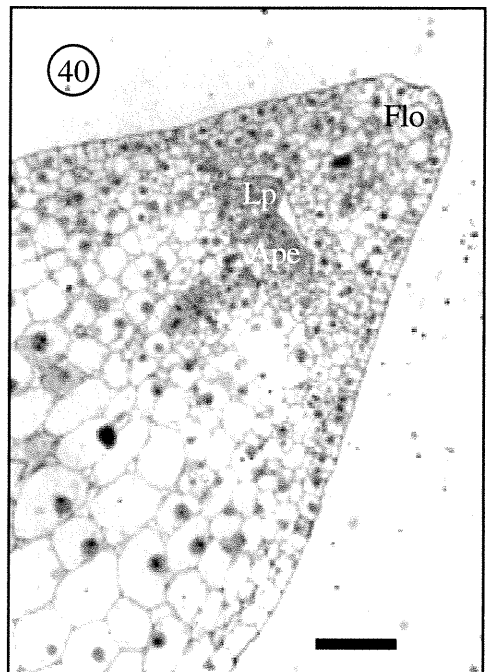


Fig. 41. Coupe transversale de l'écaille et de la première feuille du *S. cernua* montrant les faces adaxiales opposées. Échelle, 100 μ m. Fig 42. Première vraie feuille du *S. cernua* sortant du tube formé par l'écaille. Échelle, 1 mm. Fig. 43. Première vraie feuille du *S. cernua*, dépassant l'écaille qui, elle même, ne croîtra plus de façon significative. Échelle, 1 mm. Fig. 44. Tige feuillée montrant l'insertion spiralée des feuilles sur la tige du *S. cernua*. Échelle, 1 cm. Adf, face adaxiale; Flo, écaille; Ftl, première vraie feuille.

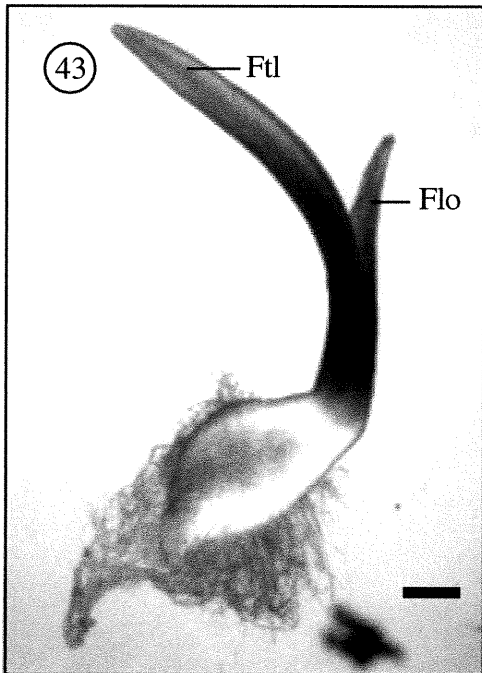
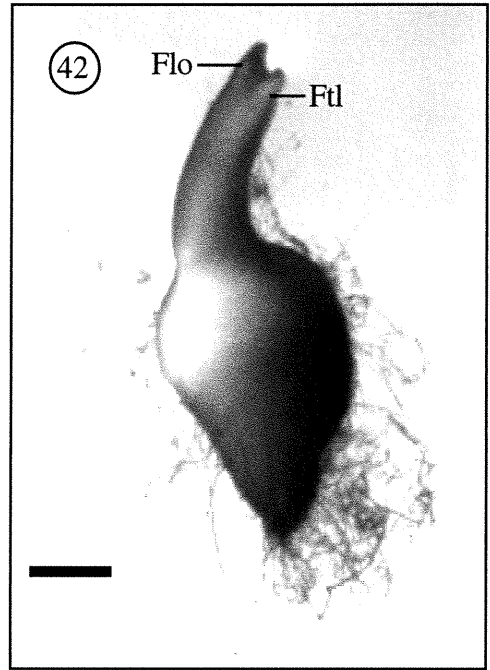
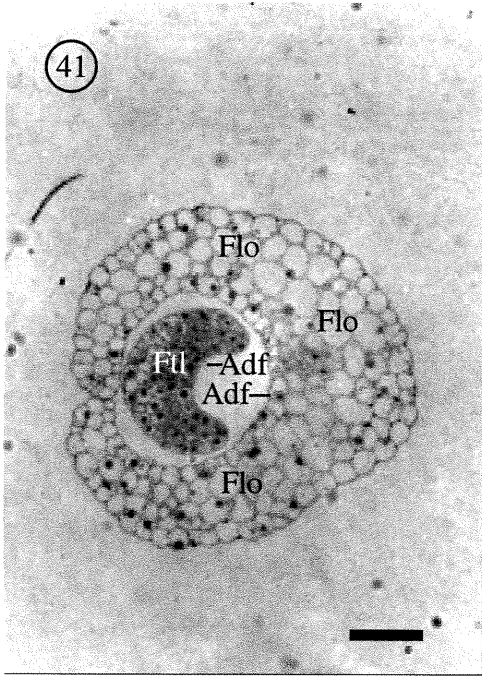


Fig. 45. La racine protocormiale du *S. cernua* débute par un renflement à la hauteur de la naissance de la première feuille. Échelle, 5 mm. Fig. 46. Racine protocormiale développée du *S. cernua*. Échelle, 5 mm. Fig. 47. Insertion de la racine protocormiale du *S. cernua* dans le protocorme. Échelle, 1 mm. Fig. 48. Poils absorbants à la surface de la racine protocormiale du *S. cernua*. Échelle, 5 mm. Prc, protocorme; Pro, insertion de la racine protocormiale dans le protocorme; Prp, primordium de la racine protocormiale; Prt, racine protocormiale; Rha, Poils absorbants.

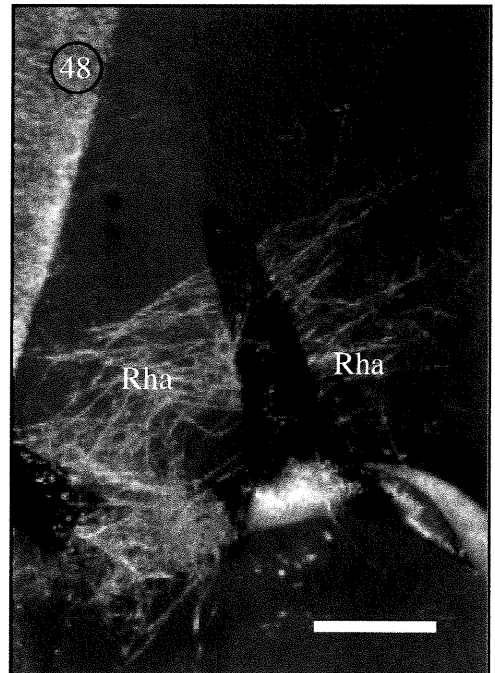
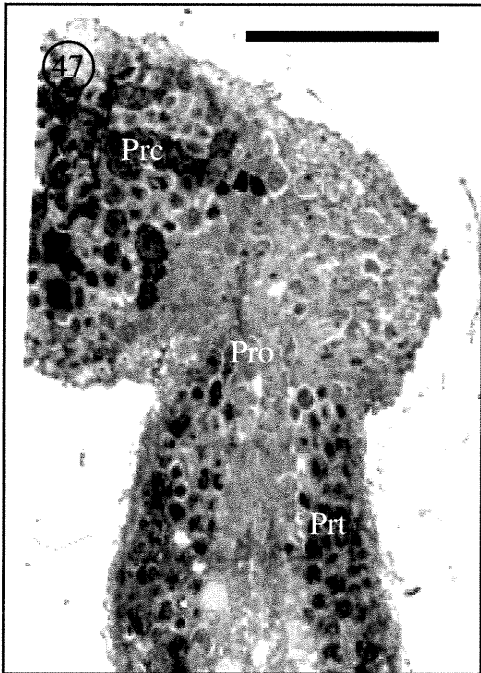
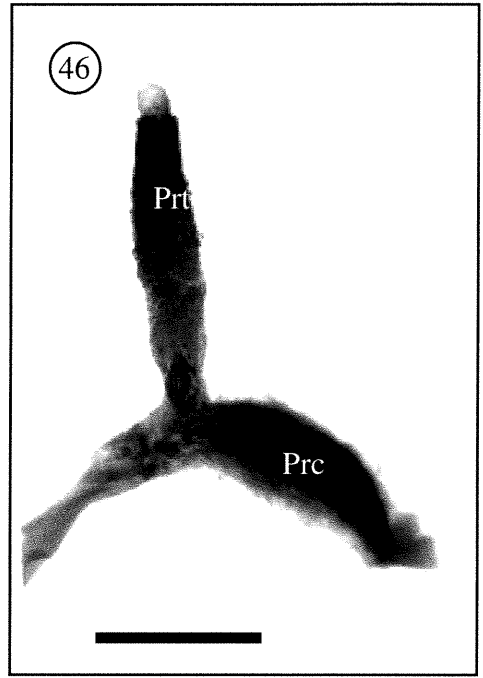


Fig. 49. Coupe de racine montrant le vélamen et l'exoderme du cortex du *S. cernua*. Échelle 100 μm . Fig. 50 Coupe de la racine montrant le cortex du *S. cernua* avec ses cellules, mycorhizées par le *C. goodyerae repentis*, et ses cellules parenchymateuses. Échelle, 500 μm . Fig 51. Coupe de racine montrant l'endoderme, le péricycle et la stèle du *S. cernua*. Échelle, 100 μm . Fig. 52. Coupe de l'extrémité de la racine montrant la coiffe et la région méristématique du *S. cernua*. Échelle, 100 μm . Cor, cortex; End, endoderme; Exo, exoderme; Per, péricycle; Rmc, cellules mycorhizées de la racine; Rme, méristème de la racine; Rpc, cellules parenchymateuses de la racine; Rtp, coiffe; Ste, stèle; Vel, vélamen.

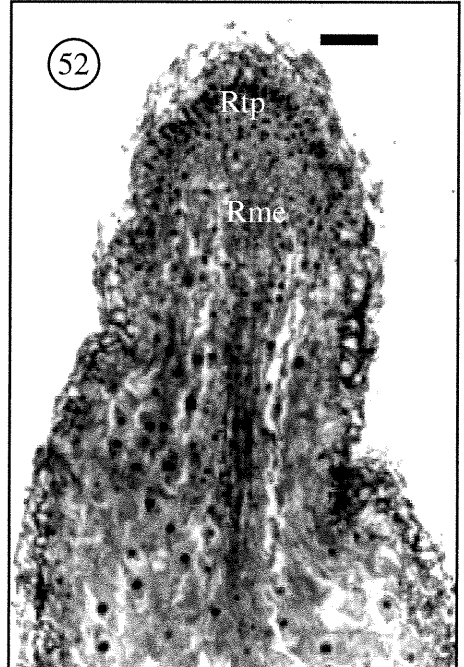
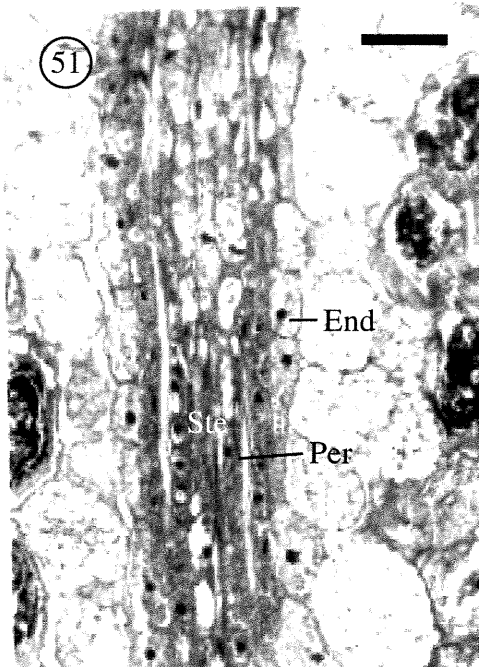
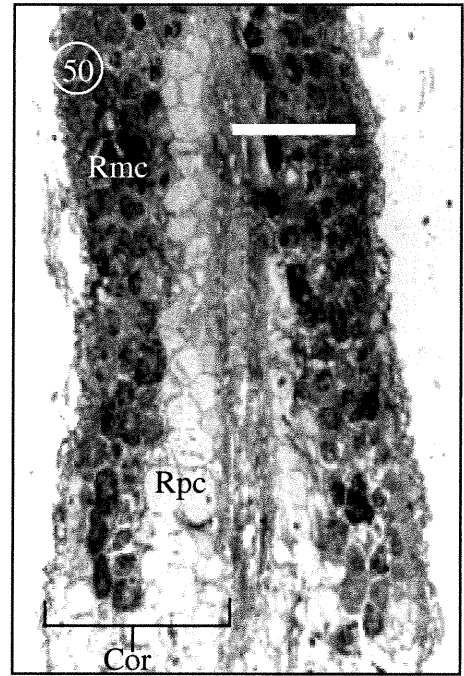
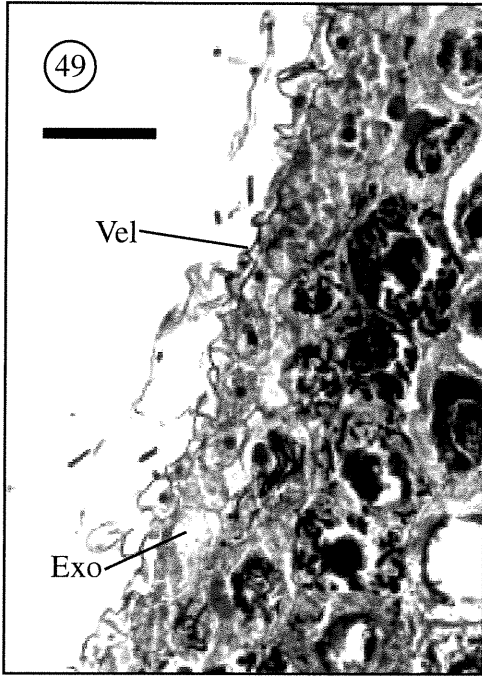


Fig. 53. Cellules du cortex de la racine du *S. cernua*, mycorhizées par le *C. goodyerae repentis*. Échelle, 100 μ m. Fig. 54. Espace entre les pelotons d'un protocorme et ceux de la racine du *S. cernua*, mycorhizées par le *C. goodyerae repentis*. Échelle, 1 mm. Fig. 55. Le faisceau vasculaire de la racine est en continuité avec le faisceau vasculaire de la racine protocormiale du *S. cernua*. Échelle, 500 μ m. Fig. 56. Des racines adventives se développent sur la tige vis-à-vis de la base de feuilles du *S. cernua*. Échelle, 5 mm. Adr, racines adventives ; Gap, espace entre les pelotons du protocorme et de la racine ; Myc, cellules mycorhizées; Prc, protocorme; Prt, racine protocormiale;. Rvb, faisceau vasculaire de la racine ; Svb, faisceau vasculaire de la tige.

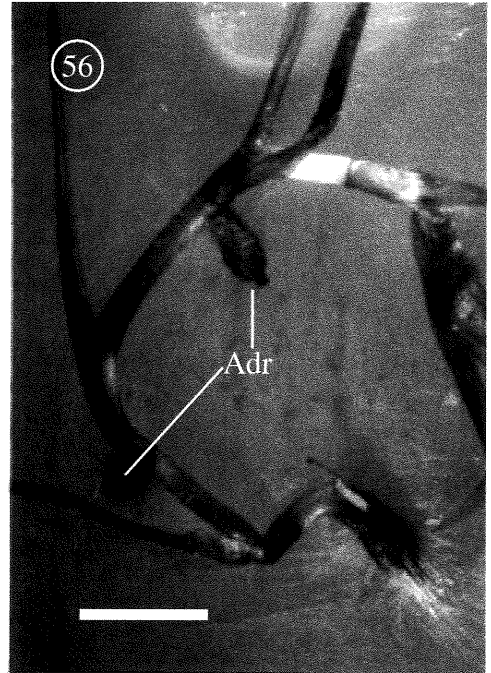
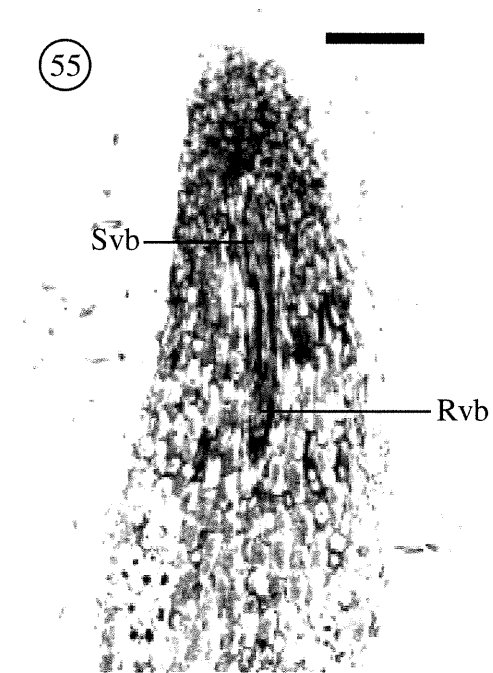
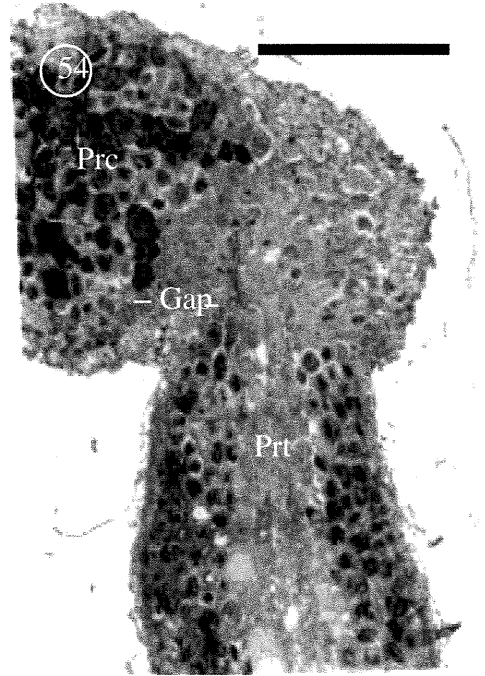
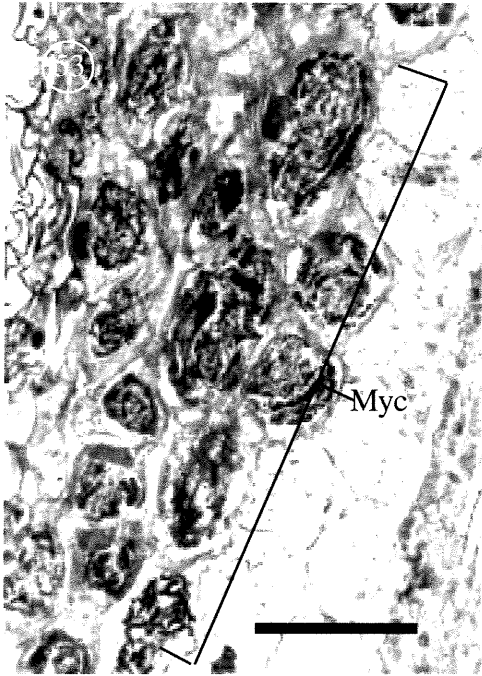


Fig. 57. Protocorme monstrueux du *S. cernua*. Échelle = 2 mm.



Chapitre 2

Tentative *in situ* pour isoler les symbiotes du *Cypripedium acaule* Ait. (Orchidacées) et étude sur la germination *in vitro* de ses graines en présence de champignons du groupe morphologique des *Rhizoctonia*.¹

¹ Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une communication sous forme d'un poster au "Second International Conference on Mycorrhiza –ICOM 2"

à Upsala, Suède en 1998, avec les auteurs suivants :

Dussault L., St-Arnaud M., Barabé D. et Fortin J. A.

Institut de recherche en biologie végétale,

4101 est, rue Sherbrooke, Montréal, Qc H1X 2B2

Sommaire

L'effet de certains champignons sur la germination du *Cypripedium acaule* a été étudié en utilisant des souches fongiques provenant d'Orchidacées Nord Américaines, autres que le *C. acaule*, mais croissant, en nature, sous des latitudes similaires à celles où l'on retrouve le *C. acaule*. Aucune symbiose mycorhizienne n'a été obtenue mais le champignon *Epulorhiza repens* (UAMH 5430) s'est révélé avoir un effet significatif ($P < 0,001$) sur le taux de germination des graines, sans qu'il y ait contact et infection de la graine par le champignon. Nous postulons qu'une substance produite par le champignon *E. repens* a été émise et a influencé la germination des graines. Une tentative pour isoler le symbiote du *C. acaule in situ* avec des graines placées dans des sachets déposés dans l'environnement radiculaire des plantes d'une colonie naturelle, sous la litière en forêt, s'est avérée infructueuse. Sur approximativement 10000 à 15000 graines semées, aucune n'a germé.

Introduction

Les Orchidacées forment une famille groupant près de 720 genres. Cette famille compte de vingt à vingt-cinq mille espèces selon Dressler (1981). Cronquist (1981) écrit qu'il y en aurait plus de 35000. Il s'agit d'un groupe de plantes fort diversifié quant à la morphologie, la physiologie et l'habitat (Dressler, 1981). Les plantes de cette famille produisent généralement de petites graines dont l'embryon compte, selon l'espèce, une cinquantaine à quelques centaines de cellules parenchymateuses peu différenciées (Burgeff, 1959). Les réserves nutritives des graines, généralement sous forme de lipides et de corps protéiques, sont peu importantes (Harrison, 1977; Richardson, Peterson et Currah, 1992) et sont confinées au proembryon. De plus, l'absence de glyoxysome les empêcherait de métaboliser le peu de réserves de lipides qu'elles possèdent (Harrison, 1977; Rasmussen, 1995). Étant donné la faible quantité de réserve énergétique se trouvant dans le proembryon, une source extérieure d'énergie est requise pour le développement de la plantule (Harrison et Arditti, 1978; Peterson, Uetake et Zelmer, 1998). En culture *in vitro*, en conditions asymbiotiques, les glucides sont fournis par l'addition de sucres simples au milieu de culture (Knudson, 1922; Lindén, 1980).

En nature, toutes les espèces d'Orchidacées passent par un stade au cours duquel elles sont hétérotrophes et doivent obtenir leurs nutriments d'une source extérieure (Smith et Read, 1997). Les glucides

leur sont fournis par un champignon avec lequel une symbiose est établie. Les protocormes d'Orchidacées terrestres vivent en parasites de champignons, sous terre, de plusieurs semaines à plusieurs années (Rasmussen et Whigham, 1993). Ces champignons, généralement du groupe morphologique des *Rhizoctonia* (Bernard, 1909; Currah, 1987; Currah, 1991; Hadley, 1982; Marchisio *et al*, 1985; Masuhara, Katsuya et Yamagushi, 1993; Rasmussen et Whigham, 1993; Smreciu et Currah, 1989; Warcup, 1981; Warcup et Talbot, 1962; Warcup et Talbot, 1967; Williamson et Hadley, 1969; Williamson et Hadley, 1970; Zelmer, Cuthbertson et Currah, 1996; Zettler, 1998), ont la capacité d'hydrolyser les glucides complexes, telle la cellulose présente dans le sol, en les réduisant en sucres simples. Ils pénètrent dans les cellules du protocorme et y forment des structures d'hyphes entremêlées appelées "pelotons" (Bernard, 1909) Ces pelotons sont éventuellement lysés par le protocorme qui s'en nourrit.

Beaucoup de questions demeurent sans réponse à propos des champignons mycorhiziens des Orchidacées et de leur rôle dans la germination symbiotique de leurs graines. Les Orchidacées du genre *Cypripedium* présentent un problème particulier. En effet, comme c'est le cas pour la majorité des Orchidacées, leurs symbiotes ne sont pas connus (Rasmussen, 1995) et la germination symbiotique des graines des espèces de ce genre n'a jamais été réalisée avec succès. Leur étroite dépendance envers leur endophyte en nature explique peut-être la difficulté de leur culture *in vitro* (Hadley et Pegg, 1989). Dans le cas du

Cypripedium acaule Ait., la germination des graines a été réalisée, au moins jusqu'au stade feuillé, en culture asymbiotique (Ballard, 1990; Leroux, Barabé et Vieth, 1995; St-Arnaud, Lauzer et Barabé, 1992) mais n'a pas été réussie en culture symbiotique. De plus, il a été suggéré que le champignon symbiote de la plante adulte pouvait être différent de celui qui s'associe à la graine lors de la germination (Rasmussen, 1995; Zelmer *et al*, 1996).

Afin d'apporter des éléments de réponse aux questions qui se posent en ce qui concerne le genre *Cypripedium*, le présent travail a pour objectifs : a) d'évaluer la capacité de germination et de croissance symbiotique *in vitro* de graines du *C. acaule* avec des souches de champignons isolés d'Orchidacées de genres différents, mais croissant sous les mêmes latitudes nordiques de l'Amérique du Nord que les *Cypripedium*; b) d'isoler le symbiote du *C. acaule* en nature en utilisant des graines insérées dans des pièges placés dans l'environnement radiculaire de plants du *C. acaule* en croissance.

Matériel et méthodes

Les graines

Les capsules ont été cueillies en septembre 1996 à St-Lazare, Qc dans une pinède et en septembre 1997 à la Station de biologie de l'Université de Montréal à St-Hippolyte, Qc dans les Laurentides. Elles ont été séchées à l'air libre à la température ambiante jusqu'à l'ouverture des capsules. En 1996, les graines des différentes capsules ont été placées ensemble dans une fiole non hermétiquement fermée. En 1997, les graines provenant de chacune des capsules ont été placées dans des fioles individuelles, à raison d'une fiole par capsule afin de pouvoir mesurer le taux de germination des graines provenant de différentes capsules. Les fioles ont été placées dans un contenant en plastique contenant un agent dessiccant (DRIERITE®). Les graines ont été conservées à une température de 4° C jusqu'à utilisation.

Pour la désinfection des semences, des tubes à dialyse en cellulose régénérée poreuse, de marque Fisherbrand®, d'une épaisseur de 20 µm ont été utilisés. La membrane constituant ces tubes permet le passage de molécules de moins de 12-14000 daltons. Les tubes ont été fendus pour former des rectangles de 25 mm par 35 mm avec lesquels des sachets d'environ 8 x 10 mm de côté ont été fabriqués. Une soixantaine de graines ont été placées dans chaque sachet. Les sachets, par groupes de 3, ont été déposés dans des cassettes porte-échantillons (Uni-Cassette®, Sakura Finetek Corp.) de 4 x 32 x 11 mm. Dans chacune

des cassettes avait été inséré un rectangle de filtre mousse de 3 mm d'épaisseur et de la grandeur des porte-échantillons comme remplissage, afin d'empêcher les sachets de se déplacer et de s'ouvrir. Les porte-échantillons ont ensuite été placés dans des Erlenmeyers contenant une solution de 250 ml de NaOCl à 0,5%, additionnée de quelques gouttes de détergent (Tween 80®). Les fioles ont été placées sous vide léger à deux reprises pour cinq minutes chaque fois. La solution a ensuite été agitée pendant 90 minutes sur un agitateur orbital à raison de 90 agitations par minutes. Les porte-échantillons et leur contenu ont été finalement rincés sous agitation dans deux bains consécutifs de 250 ml d'eau distillée en agitant pendant trente minutes à chaque bain, à raison de 90 agitations par minutes.

Les souches de champignons

Pour les essais de germination *in vitro*, 11 souches fongiques (Tableau 1) connues comme étant des symbiotes d'Orchidacées, isolées de pelotons d'Orchidacées autres que le *C. acaule*, mais croissant sous les latitudes où l'on trouve cette espèce, ont été sélectionnées. Ces souches fongiques, ont été obtenues de la University of Alberta Microfungus Collection and Herbarium (UAMH). Elles ont été conservées sur une gélose d'agar à base de dextrose de pomme de terre et repiquées sur gélose à base d'avoine broyée pour utilisation dans toutes les expériences.

Choix des milieux de croissance

Afin de sélectionner un milieu propice à la croissance du champignon et qui, en même temps, était connu comme pouvant fournir les nutriments requis pour la croissance des Orchidacées, six milieux ont été testés dans des boîtes de Petri (Tableau 2). Pour chacune des souches fongiques et pour chacun des six milieux, dix boîtes de Petri ont été préparées. La progression des hyphes sur la gélose a été vérifiée quotidiennement. Le nombre de jours requis pour que la gélose soit couverte a été noté afin de déterminer quel milieu permettait la progression la plus rapide du champignon. Une cote allant de 1 pour le milieu ayant permis la progression la plus rapide à 6 pour celui qui a fourni la progression la plus lente a été assigné à chaque milieu pour chacune des 11 souches fongiques (Tableau 3).

Première expérience *in vitro*

Pour l'ensemencement des graines, quatre milieux ont été utilisés, soit : a) CA-4 avec dextrose (CA-4+) (St-Arnaud *et al*, 1992); b) CA-4 sans sucre (CA4-); c) gélose à base d'avoine broyée (AB) (Clements, Muir et Cribb, 1986); d) gélose à base d'eau et d'agar, sans aucun nutriment (EAU). Des boîtes de Petri à deux compartiments ont été utilisées dans le cas des milieux CA4+, CA4- et EAU. L'un des deux compartiments a reçu 12 ml de milieu AB. L'autre a reçu 12 ml de l'un des milieux CA4+, CA4- ou EAU. Des boîtes de Petri sans division ont reçu 25 ml de milieu AB.

Pour l'ensemencement des graines, les sachets préalablement traités avec leurs quelque soixante graines ont été ouverts en milieu stérile, sous une hotte à flot laminaire, et ont été étendus sur la gélose appropriée, soit le milieu CA4+ ou CA4- ou EAU des boîtes de Petri bicompartimentés ou sur le milieu AB des boîtes de Petri sans division.

Afin de procéder à l'inoculation des champignons, des pastilles de 6 mm de gélose avec du mycélium ont été prélevées à la marge de la colonie des différents isolats, préalablement cultivés sur milieu AB. Une telle pastille a été placée sur le milieu AB des boîtes de Petri bicompartimentées. Une pastille a aussi été placée sur la gélose des boîtes de Petri sans division contenant du milieu AB. Un traitement sans champignon a été effectué pour chacun des milieux évalués. Dix répétitions de chacun des traitements expérimentaux, y compris le traitement témoin sans champignon, ont été effectuées

Les graines ont été semées quatre mois après la récolte, sur une période d'une semaine. Les cultures et co-cultures ont été incubées dans un incubateur à 10° C, à l'obscurité, pendant 13 semaines, après quoi la température de l'incubateur a été haussée à 22° C par tranches de 2° C par jour sur une période de six jours. Les 19 premières semaines, les graines ont été examinées à toutes les deux semaines pour des signes de germination. A partir de la 19^e semaine, le nombre de graines germées a été compté à toutes les quatre semaines pendant 26 semaines.

Deuxième expérience *in vitro*

En septembre 1997, 10 capsules du *C. acaule* ont été cueillies. Les graines, placées dans des contenants individuels pour chacune des capsules, ont été gardées dans les mêmes conditions que celles de l'expérience précédente. La stérilisation a été faite dans des sachets de cellulose régénérée poreuse, selon la méthode utilisée précédemment. Des boîtes de Petri bicompartimentées ont été utilisées pour cette expérience. Dans l'un des compartiments, du milieu AB a été placé alors que l'autre a reçu du milieu CA-4+. Le compartiment ayant reçu du milieu AB a été inoculé avec du mycélium du champignon *Epulorhiza repens* (UAMH 5430) alors que l'autre a étéensemencé avec des graines provenant de chacune des dix capsules. Dix répétitions ont été réalisées pour chacune des capsules. Des boîtes de Petri bicompartimentées contenant les mêmes milieu de culture mais qui n'ont pas été inoculées avec du champignon ont étéensemencées avec des graines provenant des mêmes capsules. Là aussi, 10 répétitions ont été faites. Les cultures et co-cultures ont été incubées dans un incubateur à 22° C, à l'obscurité. À partir de la dixième semaine, le nombre de graines germées a été noté à toutes les quatre semaines pendant 16 semaines.

Expérience *in situ*

Pour tenter de piéger le symbiote du *C. acaule in situ*, des sachets de Nytex® contenant 100 à 150 graines du *C. acaule*, placés dans des cadres de plastique de 26 x 35 mm (Rasmussen et Whigham, 1993) ont

été utilisés. En septembre 1996, seize repères auxquels étaient attachés 100 cadres ont été installés en forêt à la Station de biologie des Laurentides, de l'Université de Montréal, à l'est du lac Croche (Annexe 5, 6). Les cadres ont été enfouis sous la litière, en contact avec le sol, à 25 mm de profondeur, dans l'environnement racinaire de plants du *C. acaule* en croissance. Le site est situé au sommet d'une colline où croissent des conifères, surtout des *Pinus strobus*. Le sol, à cet endroit, est un podzol plutôt mince et sec. En octobre 1996, sept semaines après l'ensemencement en forêt et à chaque deux semaines, de mai 1997 à octobre 1997, de même que deux fois en mai, une fois en juin, deux fois en septembre et une fois en octobre 1998, trois sachets ont été retirés. Dans les jours suivant immédiatement la cueillette, les sachets ont été ouverts et examinés à la loupe binoculaire pour observer l'état des graines et l'envahissement fongique.

Résultats

Les souches fongiques

Le milieu AB a supporté la meilleure croissance de la plupart des isolats fongiques (tableau 3). C'est celui qui a été utilisé dans tous les cas pour l'inoculation des champignons. Les milieux Warcup M1 et Burgeff Sb ont permis, eux aussi, une bonne croissance des champignons, mais moindre que le milieu AB. Le milieu Knudson C s'est avéré peu efficace. Les milieux CA4+ et CA4 cellulose ont été les moins efficaces.

Première expérience *in vitro*

Aucun signe de germination n'a été observé dans les treize premières semaines d'incubation à 10° C qui ont suivi le premier ensemencement. Les premiers signes de germination (embryon sorti du tégument) ont été observées six semaines après avoir haussé la température de 10° C à 22° C, soit 19 semaines après l'ensemencement. Cette germination s'est poursuivie et a été suivie jusqu'en août 1997. Aucune mycorhize, c'est à dire formation de pelotons dans les cellules des protocormes, n'a pu être constatée lors d'examens à la loupe binoculaire. À la fin de l'expérience, il nous restait 380 boîtes de Petri sains dans l'échantillonnage. 100 boîtes de Petri ayant été retirées parce que le champignon était mort ou parce que le milieu était contaminé.

Sur un total de 21856 graines semées, cent une ont germé (tableau 4). De ces cent une graines qui ont germé, quatre-vingt-douze avaient été

ensemencées sur le milieu CA4+, soit 91,1% (tableau 4). Ce milieu a été significativement plus efficace que tout autre pour la germination des graines. La souche de champignon *E. repens* UAMH 5430 était présente, sans toutefois être en contact avec les graines, lors de la germination de cinquante-cinq graines sur un total de cent une graines germées, soit 54,5% (Tableau 4). Les boîtes de Petri inoculées avec des souches de champignons autres que UAMH 5430 n'ont produit que seize graines germées sur cent une, soit 15,8% (Tableau 4). Une analyse de variance a déterminé que ces autres champignons ont eu un effet inhibiteur sur la germination ($P < 0,05$), leur taux de germination ayant été sensiblement plus faible que celui des témoins. Dans la plupart des cas, les graines étaient détruites par le champignon. Trente graines ont germées sur cent une avec le traitement témoin sans souche fongique, soit 29,7% (Tableau 4).

Les graines semées sur le milieu CA-4+ avec le champignon *E. repens* UAMH 5430 sont celles qui ont le mieux germé avec un taux de germination de 13,5% (Tableau 4) du nombre de graines semées. Toutefois, à cause du faible nombre de l'ensemble des graines germées par rapport au nombre total de graines semées, l'analyse de variance n'a pu discriminer si *E. repens* sur milieu CA-4+ avait un effet significatif sur la germination des graines par rapport au témoin sans champignon.

Deuxième expérience *in vitro*

La deuxième expérience a été entreprise avec comme seule souche fongique le *E. repens* (UAMH 5430) afin de déterminer si cette souche avait vraiment un effet significatif sur la germination des graines. Les graines provenant de 4 des 10 capsules ont eu un taux de germination inférieur à 1% et ont été retirées de l'échantillonnage parce que trop peu viables. Les graines des six autres capsules ayant un taux de germination >1% ont été retenues.

Dans tous les cas, les boîtes de Petri avec champignon montrent des taux de germination plus élevés que ceux des témoins sans champignon (Tableau 5). Une analyse de variance démontre un effet significatif marqué du champignon sur le taux de germination ($P < 0,001$). Une différence importante a été notée quant au taux de germination des graines provenant des différentes capsules, allant de moins de 1% (les capsules rejetées) à 11,9%.

Expérience *in situ*

Dans le cadre de l'expérience réalisée *in situ*, de nombreuses hyphes de champignons de plusieurs espèces avaient envahi l'intérieur des sachets de Nytex® dans tous les cadres retirés du sol mais aucun changement dans les graines n'a pu être discerné. Aucune des graines semées en forêt n'a germé. Les proembryons ne semblaient pas avoir augmenté de volume. L'examen a permis de constater que des hyphes avaient pénétré dans le tégument des graines, mais n'a pas permis de

décélérer si le proembryon avait été affecté. Aucune tentative d'identification de ces champignons n'a été faite.

Discussion

Germination *in vitro*

La méthode utilisée pour la désinfection des graines dans des sachets en cellulose régénérée poreuse a été développée pour assurer le minimum de pertes et la plus faible manipulation possible des graines. Comme c'est le sachet ayant servi à la désinfection qui est étendu sur la gélose, il n'y a aucune perte de graine.

La sélection des milieux de culture propices à la croissance des champignons s'est faite en tenant compte du fait que certains des six milieux retenus comportent des glucides de sources différentes (Tableau 2). Le milieu CA-4, dérivé de Harvais (1982), a été développé pour la culture axénique d'Orchidacées de nos régions. Comme le rôle du CA-4, à l'origine, n'était pas de cultiver des champignons, il n'y a rien d'anormal à ce que ce milieu se soit avéré de piètre qualité pour la croissance des champignons. Le milieu AB a été retenu parce qu'il s'est avéré le plus efficace pour la culture des champignons.

Des expériences antérieures dans nos laboratoires (Lauzer, St-Arnaud et Barabé, 1994; Leroux *et al*, 1995; St-Arnaud *et al*, 1992) ont démontré la capacité du milieu CA-4+ d'induire la germination des graines du *C. acaule*. À titre expérimental, dans CA-4-, le dextrose a été remplacé par la cellulose, une source de carbone disponible en conditions naturelles, pouvant, selon certains, augmenter le taux de croissance et la masse des semis produits avec le *Goodyera repens* en présence d'un

champignon, le *Ceratobasidium cornigerum* (Hadley, 1969). Cependant, cette source de carbone a été moins efficace que le dextrose pour les fins de nos expériences et nous ne l'avons plus utilisé ultérieurement

Il semblait intéressant de savoir quel serait l'effet du milieu AB lorsque utilisé simultanément sur les champignons et sur les graines. Ce milieu avait été employé avec succès par Clements *et al* (1986) pour la culture symbiotique de 23 espèces d'Orchidacées terrestres des Iles Britanniques des genres *Dactylorhiza*, *Himantoglossum*, *Ophrys*, *Orchis* et *Serapias* en co-culture avec des champignons du genre morphologique *Rhizoctonia*. Finalement, le milieu EAU a été utilisé à titre de témoin.

Puisqu'aucun signe de germination n'était apparu dans les boîtes de Petri placées à 10° C, la température a été haussée à 22° C trois mois après l'ensemencement. La hausse de température avait pour but de stimuler la germination. Les résultats obtenus par ce changement suggèrent que la germination des graines en nature pourrait s'effectuer, pour cette espèce, lorsque le sol s'est suffisamment réchauffé.

Dans la première expérience réalisée au début de 1997, le champignon UAMH 5430 *E. repens* a permis une germination plus élevée que toutes les autres souches et que le milieu témoin sans champignon. Cependant, à cause du peu de graines qui ont germé par rapport à la quantité semée, les résultats obtenus n'ont pas permis de déterminer si cette influence avait une valeur statistiquement significative. Afin de déterminer la valeur statistique de nos résultats, une deuxième expérience a été effectuée. Dans cette deuxième expérience, le but poursuivi en

différenciant les graines provenant de capsules distinctes était d'éliminer l'impact que des graines provenant de capsules ayant un faible taux de fertilité pourraient avoir sur les résultats. Des capsules du *C. acaule* fermes et mûres portent souvent des graines qui ne germent pas, sans raison apparente (Ballard, 1990). Effectivement, les graines provenant de quatre capsules sur dix avaient, après cinq mois de culture, un taux de germination de moins de 1%. Ces graines ont été retirées de l'échantillonnage pour ne pas fausser les calculs statistiques.

Les graines semées dans les boîtes de Petri inoculée avec la souche UAMH 5430 du *E. repens* ont montré un taux de germination significativement plus élevé que celui des témoins ($P < 0,001$) (Tableau 5). Nous n'avons rien trouvé dans la littérature à l'effet qu'une augmentation significative du taux de germination de graines du *Cypripedium sp.* était attribuable à la présence d'un champignon identifié. Des graines du *C. calceolus* ont eu un taux de germination plus élevé en présence de champignons prélevés sur ou dans les racines du *C. calceolus* et du *Cephalanthera rubra* comparativement au témoin cultivé asymbiotiquement (Weinert, 1990) sans, toutefois, que des pelotons soient formés. Cependant, ce ou ces champignons n'ont pas été identifiés (Weinert, 1990). Avec l'utilisation du *Ceratobasidium sp.*, du *Tulasnella sp.* et d'un champignon indéterminé venant d'Australie, Oliva et Arditti (1984) rapportent l'apparition de protocormes blanchâtres qui dégénèrent dans le cas du *C. acaule*. Ils n'observent aucun signe de germination dans le cas du *C. californicum*. Par contre, la croissance s'arrête au stade de

protocorme dans le cas du *C. reginae*. Curtis (1939) rapporte une germination du *C. parviflorum* avec le *Rhizoctonia lanuginosa* de même que du *C. reginae* avec le *R. monilioides* et avec le *R. repens*. Cependant, il ne quantifie pas ses résultats et ne fait pas mention du stade atteint par les graines en germination. Smreciu et Currah (1989) rapportent l'absence de germination du *C. calceolus* sur milieu Warcup M1 (Warcup, 1973) cultivé avec les *Rhizoctonia anaticula*, *Ceratobasidium obscurum*, *Thanatephorus pennatus*, *Sistotrema* sp., *R. solani* et *C. cereale*. Il rapporte toutefois que des graines, provenant du même lot que celles utilisées pour les expériences en co-culture avec les champignons, avaient germées asymbiotiquement sur milieu FAST.

Nous n'avons pas tenté d'isoler la substance qui pourrait agir à distance sur la germination, par diffusion dans le milieu ou par évaporation dans l'atmosphère de la boîte de Petri. Plusieurs composés sont connus depuis un certain temps pour leurs effets sur la levée de la dormance ou sur la stimulation de la germination des graines. La gibbérelline est l'un de ces composés. Il existe une soixantaine de gibbérellines naturelles. Deux de ces gibbérellines, la GA_3 et la GA_{4+7} sont actives dans la germination des graines. Les autres semblent inactives (Mayer et Poljankoff-Mayber, 1989). Ces gibbérellines sont considérées comme des facteurs nécessaires à la germination des graines (Groot et Karssen, 1987), même si leur rôle exact n'est pas totalement compris (Mayer et Poljankoff-Mayber, 1989). Selon Salisbury et Ross (1992) la gibbérelline lève la dormance des graines d'un grand nombre de plantes en agissant comme

substitut à la basse température, à l'élongation des jours ou à la lumière rouge qui, tous trois, sont des facteurs de levée de dormance.

À l'origine, la gibbérelline a été extraite d'un champignon, le *Gibberella fujikuroi* (la forme anamorphe du *Fusarium moniliforme*). Plusieurs auteurs mentionnent la production de gibbérelline par différents champignons (Hanley et Greene, 1987; Ho, 1987; Ho et Trappe, 1992; (Kampert, Strzelczyk et Pokojaska, 1975; Strzelczyk, Sitek et Kowalsky, 1975; Strzelczyk, Pokojaska et Kampert, 1992). Une autre substance qui affecte la germination des graines est la cytokinine (Mayer et Poljankoff-Mayber, 1989). Miller (1958) a démontré la capacité de la kinétine (une cytokinine) de promouvoir la germination des graines. La zéatine, une cytokinine naturelle extraite du maïs (Letham, Shannon et McDonald, 1964), agit de la même façon que la kinétine (Mayer et Poljankoff-Mayber, 1989).

Plusieurs champignons ont été étudiés quant à leur capacité de produire des cytokinines *in vitro* (Arshad et Frankenberger, 1998). Un niveau plus élevé de cytokinine a été relevé dans des plantes mycorhizées (Allen, Moore et Christensen, 1980; Thiagarajan et Ahmad 1994).

L'éthylène C_2H_4 est une troisième substance qui stimule la germination de certaines graines. Ketring (1977) note que la germination de graines est stimulée par l'apport externe de C_2H_4 mais les connaissances sur les effets de ce gaz demeurent fragmentaires (Lieberman, 1979). Le C_2H_4 n'agirait pas sur la levée de la dormance mais

plutôt sur des événements subséquents à la levée tout au moins partielle de la dormance (Kępczynski et Karssen, 1985). Une évidence directe de la nécessité du C_2H_4 pour la germination des graines de l'*Amaranthus* sp a été démontrée par (Kępczynski et Karssen, 1985).

Graham et Linderman (1980) ont trouvé que 23 espèces de champignons ectomycorhiziens qu'ils avaient étudiés produisaient du C_2H_4 lorsque cultivés sur un milieu contenant de la méthionine. Des semis de sapin Douglas cultivés en culture aseptique produisaient du C_2H_4 lorsque inoculés avec le *Cenococcum geophilum* ou le *Heleboma crustuliniforme* ou encore le *Laccaria laccata*. Or, cette production de C_2H_4 coïncide avec la formation de la mycorhize (Graham et Linderman, 1980).

D'autres stimulateurs de germination existent comme, par exemple, le nitrate de potassium KNO_3 ou la thiourée $CS(NH_2)_2$ (Mayer et Poljankoff-Mayber, 1989), mais ces substances ne sont pas produites par les champignons, et sont hors de notre contexte.

Des substances stimulatrices de la germination peuvent donc être produites par des champignons. Comme le champignon *E. repens* UAMH 5430 n'était pas en contact avec les graines du *C. acaule* au moment de leur germination et comme le taux de germination des graines a été plus élevé que les témoins sans champignon, nous émettons l'hypothèse qu'il y a eu production par cette souche fongique d'une substance stimulant la germination des graines. Cette substance aurait diffusé dans le milieu ou

dans l'atmosphère de la boîte de Petri et aurait affecté la germination des graines.

Germination *in situ*

Les raisons pour lesquelles les graines du *C. acaule* n'ont pas germé en milieu naturel ne nous sont pas connues. Rasmussen et Whigham (1993) rapportent, dans des circonstances similaires, une absence de germination chez le *Liparis lilifolia* et chez le *Tipularia discolor*. Nous savons que les graines que nous avons utilisées étaient fertiles pour avoir utilisé avec succès, en culture *in vitro*, des graines provenant du même lot. Curtis (1943) signale que, bien que le *C. acaule* soit assez commun dans des sols secs et sablonneux sous des pins et des chênes (un milieu ayant certaines caractéristiques d'acidité et de sécheresse le rapprochant de celui où s'est tenu notre expérience), il n'avait trouvé de plantules que dans un site de ce type, au Witmer Stone Bird Sanctuary, Cape May Point, New Jersey. Il se peut que les graines aient une longue viabilité et qu'elles attendent des circonstances favorables pour germer en nature (Ballard, 1990; Stoutamire, 1990). Il se peut aussi que la germination, en nature, soit un événement très rare et que le nombre de graines que nous avons semées et récoltées (entre 10,000 et 15,000) soit insuffisant pour révéler même une seule germination. Nous estimons à plusieurs dizaines de mille le nombre de graines du *C. acaule* dans une capsule moyenne. La grande quantité de graines contenues dans une capsule (>54,000 selon (Arditti, 1992) permettrait une colonisation assez

rapide des sites même si seulement quelques graines par capsules
germaient chaque année.

Conclusions

Les graines du *C. acaule* provenant de capsules différentes n'ont pas le même taux de viabilité. Elles montrent une grande différence dans leur capacité de germination.

Les résultats négatifs de l'expérience en forêt nous portent à formuler deux hypothèses : soit que la germination des graines du *C. acaule* est un événement rare mais que le grand nombre de graines produites par capsule compenserait pour cette rareté, soit que les graines doivent attendre des conditions favorables pour germer.

Compte tenu qu'aucune graine n'a germé en condition *in vitro* après 13 semaines de culture à 10° C, il est possible que la germination ne se produise que lorsque le sol est suffisamment réchauffé. Des études plus poussées permettraient d'élucider ce point.

L'expérience n'a pas permis d'obtenir de véritables mycorhizes du *C. acaule* avec les champignons que nous avons utilisés. Au contraire, la présence de la plupart de ces champignons (sauf *Epulorhiza repens*) inhibe la germination des graines. Toutefois, elle confirme la capacité du *E. repens* de rehausser le taux de germination de ces graines sur milieu CA4+ par la production d'une substance volatile ou diffusant dans le milieu. Cette substance ne nous est pas connue et nous croyons qu'il serait intéressant de tenter de l'isoler.

Bibliographie

- Allen M. F., Moore T. S. et Christensen M. (1980). "Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae : 1. Cytokinin increase in the host plant." Canadian Journal of Botany **58**: 371 - 374.
- Arditti J. (1992). Fundamentals of Orchid biology. John Wiley and sons, New York. 691 pages.
- Arshad M. et Frankenberger W. T. (1998) "Plant growth regulating substances in the rhizosphere : microbial production and functions". Advances in agronomy. ed. D. L. Sparks. San Diego, Academic Press Inc. **62**.
- Ballard W. B. (1990). "Further notes on *Cypripedium* germination". North American native Orchid propagation and production conference, Chadds Ford, Pa : Brandywine Conservatory. 87 - 89
- Bernard N. (1909). "L'évolution dans la symbiose: Introduction; Maladie et symbiose; Symbiose et évolution; Les modes de développement des Orchidées; Diverses conditions équivalentes à la symbiose." Annales des sciences naturelles Neuvième série(Tome IX): 1 - 196.
- Burgeff H. (1959). "Mycorrhiza of Orchids" (Chapter 9). The Orchids. A scientific survey. ed. Carl L Withner. New York, The Ronald Press Co. 361 - 395.

- Clements M. A., Muir H. et Cribb P. J. (1986). "A preliminary report on the symbiotic germination of European terrestrial Orchids." Kew Bulletin **41**(2): 437 - 445.
- Cronquist A. (1981). "An integrated system of classification of flowering plants". New York, Columbia University Press. 1262 pages.
- Currah R. S. (1987). "*Thanatephorus pennatus* sp. nov. isolated from mycorrhizal roots of *Calypso bulbosa* (Orchidaceae) from Alberta." Canadian Journal of Botany **65**: 1957-1960.
- Currah R. S. (1991). "Taxonomic and developmental aspects of the fungal endophyte of terrestrial Orchids mycorrhizae." Lindleyana **6**(4): 211 - 213.
- Curtis J. T. (1939). "The relation of specificity of Orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis." American Journal of Botany **26** : 390 - 398.
- Curtis J. T. (1943). "Germination and seedling development in five species of *Cypripedium* L." American Journal of Botany **30** : 199 - 205.
- Dressler R. L. (1981). "The Orchid - Natural history and classification Cambridge, Mass., Harvard University Press. 332 pages.
- Graham J. H. et Linderman R. G. (1980). "Ethylene production by ectomycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pini*, and by aseptically synthesized ectomycorrhizal and *Fusarium* infected Douglas fir roots." Canadian Journal of Microbiology **26**: 1340 - 1347.

- Groot S. P. C. et Karssen C. M. (1987). "Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening : a study with gibberellin-deficient mutants." Planta **171**: 525 - 531.
- Hadley G. (1969). "Cellulose as a carbon source for Orchid mycorrhiza." New Phytologist **68**: 933-939.
- Hadley G. (1982). "Orchid mycorrhiza". Orchid biology review and perspective II. ed. J. Arditti Ithaca, Cornell University Press. 84-118.
- Hadley G. et Pegg G. F. (1989). "Host-fungus relationship in Orchids mycorrhizal system". Modern methods in Orchid conservation. ed. H. W. Prichard. Cambridge, Cambridge University Press. 51 – 71.
- Hanley K. M. et Greene D. W. (1987). "Gibberellin-like compounds from two ectomycorrhizal fungi and the GA3 response on Scotch pine seedlings." Horticultural Sciences **22**(4): 592 - 594.
- Harrison C. R. (1977). "Ultrastructural and histochemical changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae)." Botanical Gazette **138 (1)**: 41-45.
- Harrison C. R. et Arditti J. (1978). "Physiological changes during the germination of *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae)." Botanical Gazette **139 (2)**: 180 - 189.
- Harvais G. (1982). " An improved culture medium for growing the Orchid *Cypripedium reginae* axenically." Canadian Journal of Botany **60**: 2547- 2555.

- Ho I. (1987). "Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production." Canadian Journal of Forestry Ressource **17**: 31 - 35.
- Ho I. et Trappe J. M. (1992). "Enzymatic activity and phytohormone production of *Tricholoma magnivelare* (Peck) Redhead the 'American matsutake'". Indian Journal of Mycological Plant Pathology. **22**: 66 - 72.
- Kampert M., Strzelczyk E. J. M. et Pokojska A. (1975). "Production of gibberellin-like substances by bacteria and fungi isolated from mycorrhizae of pine (*Pinus sylvestris* L.) ." Acta Microbiologia Polonica série B. **7**: 157 - 166.
- Kępczynski J. et Karssen C. M. (1985). " Requirement for the action of endogenous ethylene during germination of non-dormant seeds of *Amaranthus caudatus*." Physiologia Plantarum **63**: 49 - 52.
- Ketring D. L. (1977). ".Ethylene and seed germination". The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination. ed. A. A. Khan. Elsevier, North Holland Biochemical Press. 157 – 178.
- Knudson L. (1922). "Non-symbiotic germination of Orchid seeds." Botanical Gazette **73**: 11 - 25.
- Knudson L. (1946). "A new nutrient solution for the germination of Orchid seeds" American Orchid Society Bulletin **15(5)** : 214 - 217,
- Lauzer D., St-Arnaud M. et Barabé, D. (1994). "Tetrazolium staining and *in vitro* germination of mature seeds of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae)." Lindleyana **9(3)**: 197-204.

- Leroux G., Barabé D. et Vieth J. (1995). "Morphogénèse comparée de protocormes du *Cypripedium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre." Can. Journal of Botany **73**: 1391 - 1406.
- Letham D. S., Shannon J. S. et McDonald I. R. (1964). "The structure of zeatin, a factor inducing cell division." Proceedings of the Chemical Society: 230 - 231.
- Lieberman M. (1979). "Biosynthesis and action of ethylene". Annual Review of Plant Physiology. ed. Briggs W. Green P. Jones R. L. Palo Alto, Ca., Annual Revue Inc. **30** :533 - 591
- Lindén B. (1980). "Aseptic germination of Northern terrestrial Orchids." Annales Botanici Fennici **17**: 174-182.
- Marchisio V. F., Berta G., Fontana A. et Mannina F. M. (1985). "Endophytes of wild Orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructures and cytochemical characterisation." New Phytologist **100**: 623 - 641.
- Masuhara G., Katsuya K. et Yamagushi K. (1993). "Potential for symbiosis of *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* with seeds of *Spiranthes sinensis* var *amoena* *in vitro*." Mycorrhizal Research **97**: 746-752.
- Mayer A. M. et Poljankoff-Mayber A. (1989). "The germination of seeds". Oxford, Pergamon Press Pic. 263 pages.
- Miller C. O. (1958). "The relationship of the kinetin and red light promotion of lettuce seed germination." Plant Physiology **33**: 115 - 117.

- Oliva A. P. et Arditti J. (1984). "Seed germination of North American Orchids. II. Native California and related species of *Aplectrum*, *Cypripedium*, and *Spiranthes*." Botanical Gazette **145**(4): 495-501.
- Peterson R. L., Uetake Y. et Zelmer C. (1998). "Fungal symbioses with Orchid protocorms." Symbiosis **25**: 29 - 55.
- Rasmussen H. N. (1995). Terrestrial Orchids: from seed to mycotrophic plant. Cambridge, Cambridge University Press. 440 pages.
- Rasmussen H. N. et Whigham D. F. (1993). "Seed ecology of dust seeds *In situ*: a new study technique and its application in terrestrial Orchids." American Journal of Botany **80**(12): 1374 - 1378.
- Richardson K. A., Peterson R. L. et Currah R. S. (1992). "Seed reserve and early symbiotic protocorm development of *Platanthera hyperborea* (Orchidaceae)." Canadian Journal of Botany **70** : 291 - 300.
- Salisbury F. B. et Ross C. W. (1992). Plant physiology. Belmont, Ca., Wadsworth Publishing Co. 682 pages.
- Smith S. et Read D. J. (1997). "Mycorrhizal symbiosis". San Diego, Cal. London, U. K., Academic Press Harcourt Brace & Co. 605 pages.
- Smreciu E. A. et Currah R. S. (1989). "Symbiotic germination of seeds of terrestrial orchids of North America and Europe." Lindleyana **1**: 6-15.
- St-Arnaud M., Lauzer D. et Barabé D. (1992). "*In vitro* germination and early growth of seedlings of *Cypripedium acaule* (Orchidaceae)." Lindleyana **71**(1): 22-27.

- Stoutamire W. (1990). "Eastern American *Cypripedium* species and the biology of *Cypripedium candidum*". North American native Orchid propagation and production conference, Chadds Ford, Pa. : Brandywine Conservatory. 40 - 48
- Strzelczyk E., Pokojska A. et Kampert M. (1992). "The effect of pH on production of plant growth regulators by mycorrhizal fungi." Symbiosis **14**: 201 ; 215.
- Strzelczyk E., Sitek J. et Kowalsky S. (1975). "Production of gibberellin-like substances by fungi isolated from mycorrhizae of pine (*Pinus sylvestris* L.)" Acta Microbiologica Polonia **24** : 145 - 153." Acta Microbiologica Polonia **24**: 145 - 153.
- Thiagarajan T. R. et Ahmad M. H. (1994) "Phosphatase activity and cytokinin content in cowpeas (*Vigna unguiculata*) inoculated with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus" Biology and Fertility of Soils **17** : 51 – 56.
- Warcup J. H. (1973). "Symbiotic germination of some Australian terrestrial Orchids." New Phytologist **72**: 387 - 392.
- Warcup J. H. (1975). Factors affecting symbiotic germination of Orchid seeds. Dans: Endomycorrhizas proceedings of a symposium held at the University of Leeds, 22-25 July 1974. (ed. F. E. Sanders) Academic Press, London Eng. p. 87 - 104.
- Warcup J. H. (1981). "The Mycorrhizal relationship of Australian Orchids." New Phytologist **87**: 371 - 381.

- Warcup J. H. et Talbot P. H. B. (1962). "Ecology and identity of mycelia isolated from soil." Transactions British Mycological Society. **45**(4): 495 - 518.
- Warcup J. H. et Talbot P. H. B. (1967). "Perfect states of *Rhizoctonia* associated with Orchids." New Phytologist. **66**: 631 - 641.
- Weinert M. (1990). "Keimungsfördernde Faktoren bei schwerkeimenden europäischen Orchideen. 1. Bodenpilze und Agarbedeckung." Die Orchidee **41**: 127 - 133.
- Williamson B. et Hadley G. (1969). "DNA content of nuclei in Orchid protocorms symbiotically infected with *Rhizoctonia*." Nature **222**: 582 - 583.
- Williamson B. et Hadley G. (1970). "Penetration and infection of Orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates." Phytopathology. **60**: 1092 - 1096.
- Zelmer C. D., Cuthbertson L. et Currah R. S. (1996). "Fungi associated with terrestrial Orchid mycorrhizas, seeds and protocorms." Mycoscience **37**: 439 - 448.
- Zettler L. W. (1998). "Orchid conservation in the 21st century : The value of including mycorrhizal fungi to preserve endangered species." North American Native Orchid Journal. **4**(3): 261 - 269.

Tableau 1

Liste des souches fongiques utilisées

Numéro de collection	Espèce
UAMH 5430	<i>Epulorhiza repens</i>
UAMH 5436	<i>Epulorhiza</i> sp.
UAMH 5658	<i>Rhizoctonia repens</i>
UAMH 5659	<i>Rhizoctonia</i> sp.
UAMH 5680	<i>Rhizoctonia</i> sp.
UAMH 6440	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>
UAMH 6443	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>
UAMH 6446	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>
UAMH 6452	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>
UAMH 6464	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>
UAMH 6465	<i>Ceratorhiza goodyerae repentis</i>

Tableau 2

Choix des milieux propices à la croissance des champignons

Nom du milieu	Origine	Glucide
Burgeff Sb	Selon Warcup, 1975	Amidon
Knudson C	Knudson, 1946	Saccharose
Warcup M1	Warcup, 1973	Cellulose
CA-4 dextrose	St-Arnaud et al, 1992	Dextrose
CA-4 cellulose	St-Arnaud et al, 1992	Cellulose
Avoine broyée	Clements et al, 1986	Divers dans les grains d'avoine

Tableau 3

Classification de six milieux quant à la rapidité avec laquelle ils induisent
la croissance de différents isolats fongiques

Numéro de Collection UAMH	Burgeff SB	Warcup M1	CA4 Dextrose	CA4 Cellulose	Knudson C	Avoine broyée
5430	2	3	5	6	4	1
5436	2	1	6	5	4	3
5659	3	2	6	4	5	1
5680	2	3	6	5	4	1
6440	2	3	6	4	5	1
6443	5	6	2	3	4	1
6446	2	6	4	5	3	1
6452	2	3	6	5	4	1
6465	3	2	6	4	5	1
TOTAL	23	29	47	41	38	11

Tableau 4

**Nombre de graines semées et
de graines germées par milieu et par
souche fongique**

Milieux de culture	CA-4+			CA-4-			AB			EAU		
	Nombre de graines			Nombre de graines			Nombre de graines			Nombre de graines		
	Semées	Germées	%	Semées	Germées	%	Semées	Germées	%	Semées	Germées	%
Souche fongique UAMH												
5430	386	52	13,5	508	0	0	528	3	0,6	395	0	0
5436	521	4	0,8	752	1	0,1	600	0	0	353	0	0
5658	355	0	0	376	0	0	620	0	0	603	0	0
5659	584	1	0,2	604	0	0	730	0	0	612	0	0
5680	216	2	0,9	480	2	0,4	503	0	0	258	0	0
6440	430	0	0	689	0	0	514	0	0	591	0	0
6443	503	0	0	231	0	0	365	0	0	300	0	0
6446	425	3	0,7	434	0	0	622	0	0	394	0	0
6452	567	0	0	392	0	0	468	0	0	203	0	0
6464	171	0	0	233	0	0	607	0	0	134	0	0
6465	563	1	0,2	449	2	0,4	570	0	0	360	0	0
Témoin	471	29	6,2	450	1	0,2	564	0	0	172	0	0
Total	5192	92	1,8	5598	6	0,1	6691	3	0,1	4375	0	0

Tableau 5

Effet du *Epulorhiza repens* UAMH 5430 sur la germination
des graines du *C. acaule*

No. de capsule	1		2		3		4		5		6	
	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC
Total graines semées	512	625	383	519	388	566	705	833	874	1014	579	633
C germées	49		23		24		54		104		54	
SC germées		25		19		27		32		85		22
% germé	9,6	4,0	6,0	3,7	6,2	4,8	7,7	3,8	11,9	8,4	9,3	3,5

C germées = avec souche *E. repens* UAMH 5430.

SC germées = témoin sans champignon .

Conclusion générale

L'étude de la germination des graines du *S. cernua* et du *C. acaule* en présence de champignons symbiotes d'Orchidacées terrestres des zones tempérées nous a permis de noter deux phénomènes différents mais complémentaires. Dans le cas du *S. cernua*, nous avons pu suivre le développement morphologique du protocorme et des différents organes de la plante, en symbiose avec son endophyte. Ce développement a été suivi depuis la graine jusqu'à la plante feuillée et l'apparition des racines. Le déroulement du phénomène nous a permis d'établir un cadre de référence pour des études ultérieures. Dans le cas du *C. acaule*, bien que nous n'ayons pas réussi à isoler son symbiote naturel *in situ* ou à établir une symbiose mycorhizienne *in vitro*, nous avons pu démontrer que le champignon *E. repens* UAMH 5430 augmentait significativement le taux de germination des graines par la production d'une substance qui ne nous est pas connue.

Il demeure toutefois que les connaissances sur les échanges entre une Orchidacée et son champignon symbiote sont très restreintes. Quelle est cette substance qui augmente le taux de germination des graines du *C. acaule*? Pourquoi le champignon prend-t-il une forme si caractéristique de peloton dans les cellules du proembryon et du protocorme? Quel est le phénomène qui incite la graine à poursuivre sa germination en présence du champignon? Que puisent la graine ou le protocorme dans le milieu et quels nutriments reçoivent-ils du champignon en plus des sucres simples

qui leur fournissent leur énergie? Le champignon ne semble rien retirer de l'association symbiotique mais pourquoi n'a-t-il pas su s'adapter à cette symbiose et à en prendre avantage? Ou alors en retire-t-il peut-être un bénéfice que nous n'avons pas encore pu percevoir? Des études pourraient sans doute nous fournir des réponses à ces questions et à d'autres encore. Dans cette optique, le *S. cernua* peut s'avérer un outil précieux pour de telles recherches.

ANNEXE 1

Déshydratation par une série ascendante d'éthanol dans l'eau.

Éthanol (%)	temps d'immersion (mn)	température (° C)
10	10	4
30	10	4
50	10	4
70	15	4
90	20	TA
100	15	TA
100	15	TA
100	30	TA

TA = température ambiante.

ANNEXE 2

Infiltration des spécimens avec de la résine acrylique (London Resin de L. R. White) par une série ascendante dans l'éthanol.

Proportion (résine :éthanol)	Temps d'immersion
1 :3	une nuit
1 :2	2 heures
1 :1	2 heures
2 :1	2 heures
3 :1	2 heures
100% résine	une nuit
100% résine	8 heures

Les spécimens sont ensuite placés dans des capsules de gélatine de 6mm x 15 mm qui contiennent de la résine 100%. Les capsules sont placées dans un four à 60° C pendant 24 heures pour la polymérisation de la résine.

ANNEXE 3

Déshydratation par une série ascendante d'éthanol/butanol III dans l'eau.

Ethanol ml	Butanol III ml	Eau ml	Traitement Nombre, temps
2,5 ⁽¹⁾	0,5	7,0	1 de 1 heure
3,5	0,5	6,0	3 de 1 heure
4,0	1,0	5,0	1 de 2 heures
5,0	2,0	3,0	1 de 1 nuit
5,0	3,5	1,5	1 de 2 heures
4,5 ⁽²⁾	5,5	0,0	1 de 2 heures
2,5 ⁽³⁾	7,5	0,0	2 de 2 heures
0,0 ⁽⁴⁾	10,0	0,0	1 de une nuit

- 1.- Les 6 premières opérations ont été faites sous vide partiel.
- 2.- Une goutte d'érythrosine 1% dans de l'éthanol a été ajoutée à ce stade.
- 3.- Les 2 dernières opérations ont été faites à pression atmosphérique
- 4.- La dernière opération a été effectuée dans une étuve à 28° C

ANNEXE 4

Infiltration et montage des spécimens dans la paraffine.

Deux bains de 4 heures chacun dans un mélange à part égale de butanol III : paraffine, sous vide, dans une étuve à 56° C.

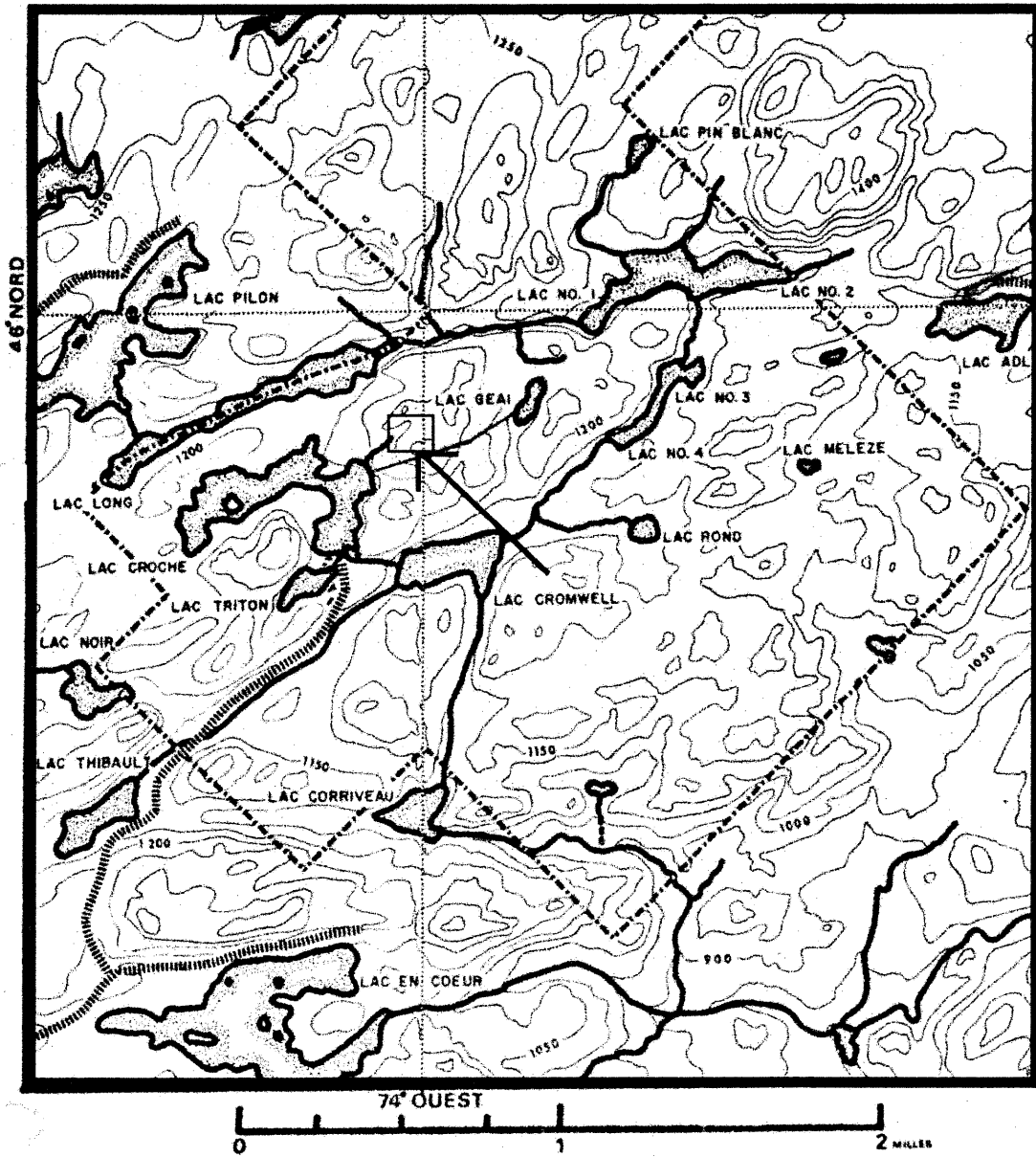
Un bain dans la paraffine pure pendant une nuit, sous vide, dans une étuve à 56° C.

Enrobage dans un bloc de paraffine, par immersion dans un moule rempli de paraffine fondue et placé sur une plaque chauffante à 56° C. Le bloc dans son moule est refroidi dans un réfrigérateur à 4° C durant une nuit.

ANNEXE 5

Localisation de l'expérience in situ à la Station de biologie des Laurentides

(Université de Montréal), à St Hippolyte, Qc .



ANNEXE 6

Localisation des repères dans l'expérience *in situ* à la Station de biologie
des Laurentides (Université de Montréal), à St Hippolyte, Qc

