

Université de Montréal

Effet de la symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules sur le développement  
de mycoses racinaires: identification des mécanismes d'action

par

Marc St-Arnaud

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en sciences biologiques

Juillet 1997

© Marc St-Arnaud, 1997



QK

3

U54

1998

V.005

## Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Effet de la symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules sur le développement  
de mycoses racinaires: identification des mécanismes d'action

présentée par

Marc St-Arnaud

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Jury :	Peter Neumann Président-rapporteur	Yves Piché Membre du jury
	J.-André Fortin Directeur de recherche	Robert Linderman Examineur externe <i>USDA-ARS Horticultural Crops Research Laboratory USA</i>
	Michel Caron Codirecteur	

Représentant du doyen de la FES: Alexandre Sasarman  
Professeur titulaire  
Département de microbiologie et immunologie

Thèse acceptée le : .....



## *Sommaire*

Cette étude porte sur l'effet de la symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules (EVA) sur le développement des maladies parasitaires chez les plantes. Plus spécifiquement, l'objectif général est de préciser les processus qui interviennent dans l'interaction entre la plante hôte, le champignon EVA et le parasite.

Une analyse exhaustive de la littérature montre que les mycoses foliaires et les viroses sont généralement favorisées chez les plantes EVA, alors que les bactérioses ainsi que les mycoses et maladies à nématodes racinaires sont généralement diminuées. Ces tendances ont constitué le point de départ de l'étude. L'hypothèse de base est que la symbiose EVA favorise une réduction des maladies racinaires. Les mécanismes impliqués ne sont pas bien définis. Les mécanismes potentiels comprennent l'augmentation d'assimilation du phosphore par la plante hôte, l'induction de ses mécanismes de résistance, une interaction directe entre le champignon EVA et le parasite, ainsi que l'installation d'une microflore défavorable au parasite sous l'influence de la symbiose. L'approche adoptée consiste à écarter graduellement les mécanismes non essentiels à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose afin de préciser celui ou ceux qui joueraient un rôle déterminant.

Nous avons montré que l'inhibition du champignon parasite *Pythium ultimum* dans les racines d'une plante hôte, ainsi que de sa population dans la rhizosphère, conférée par la symbiose, ne s'explique pas uniquement par augmentation de disponibilité du phosphore. Nous avons aussi montré que cette inhibition n'est pas liée à l'importance de la colonisation racinaire par le champignon EVA, minimisant de ce fait la possibilité d'une compétition intraracinaire entre les champignons.

Nous avons conçu un système de culture *in vitro* compartimenté, permettant d'obtenir un mycélium de champignon EVA aseptique et séparé de l'influence des racines hôtes, afin d'étudier l'interaction directe avec un autre microorganisme. Accessoirement, cela nous a permis d'obtenir une densité de sporulation en conditions aseptiques suffisante pour envisager la fabrication d'inoculum à grande échelle, ce qui a servi de base à l'obtention

d'un brevet US. Ces résultats ont en outre permis de suggérer un nouveau rôle écologique aux exsudats racinaires: près des racines, ils pourraient stimuler la germination des spores et la formation des structures infectieuses, mais réprimer la sporulation et la formation des structures d'absorption. Celles-ci seraient alors produites loin de l'influence des racines, où le niveau de nutriments est plus élevé et l'occupation plus faible.

Ce système *in vitro* nous a permis de démontrer, pour la première fois, un effet clair et direct d'une culture pure de champignon EVA sur un parasite, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, sous des conditions qui excluent une influence externe. Cela implique que les champignons EVA ont le potentiel d'influencer directement les autres microorganismes de la rhizosphère et appuie l'hypothèse d'interaction directe avec les autres microorganismes, ce qui présente beaucoup d'intérêt dans la compréhension de la dynamique microbienne dans la mycorrhizosphère. Nous avons suggéré une hypothèse originale de réduction de la population de microorganismes pathogènes dans le sol, basée sur la stimulation directe des propagules situées près du réseau d'hyphes EVA. Les résultats ont aussi montré que l'antibiose n'était pas un mécanisme impliqué dans cette interaction sous ces conditions.

Nous avons démontré, pour la première fois, que la présence d'un champignon EVA peut réduire le développement d'un parasite spécifique, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, chez une espèce hôte non mycorhizienne. Les résultats indiquent que l'effet n'est manifestement pas relié à l'installation d'une symbiose fonctionnelle et n'est définitivement pas nutritif. La résistance induite n'a pas été éliminée totalement comme mécanisme possible, mais le contexte la rend peu probable et une interaction microbienne directe ou indirecte dans le sol est apparue comme étant le facteur le plus vraisemblable pour expliquer l'inhibition de la maladie.

**Mots-clés:** Glomales, parasite, maladie, lutte biologique, sporulation, inoculum, conidie, germination, *Pythium*, *Fusarium*, *Glomus*, *Daucus*, *Tagetes*, *Dianthus*

## ***Table des matières***

Sommaire.....	iii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiii
Avant-propos.....	xv
Chapitre 1. <i>Introduction générale</i> .....	1
Bibliographie.....	5
Chapitre 2. <i>Endomycorhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels</i> .....	7
Résumé .....	8
Summary.....	9
Introduction .....	10
Maladies foliaires causées par des champignons.....	15
Maladies causées par des bactéries.....	17
Maladies causées par des virus.....	17
Maladies des racines causées par des champignons .....	20
Maladies des racines causées par des nématodes .....	21
Mécanismes d'interaction .....	22
<i>Modification de la nutrition</i> .....	22
<i>Stimulation des mécanismes de résistance de la plante</i> .....	27
<i>Effet indirect par modification de la microflore</i> .....	30
<i>Interaction directe entre le champignon endomycorhizien et le microorganisme parasite</i> .....	31
Conclusion .....	33
Remerciements .....	34
Bibliographie.....	35

Chapitre 3. <i>Inhibition of Pythium ultimum in roots and growth substrate of mycorrhizal Tagetes patula colonized with Glomus intraradices</i> .....	52
Résumé .....	53
Summary .....	54
Introduction .....	55
Materials and methods .....	57
<i>Experimental design</i> .....	57
<i>Mycorrhizal inoculum</i> .....	57
<i>Pathogen inoculum</i> .....	57
<i>Production of plants and inoculation</i> .....	58
<i>Growth conditions</i> .....	59
<i>Parameters measured</i> .....	59
<i>Statistical analysis</i> .....	60
Results .....	61
Discussion .....	69
Acknowledgement .....	73
Literature cited .....	74
 Chapitre 4. <i>Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices in an in vitro system in the absence of host roots</i> .....	 79
Résumé .....	80
Summary .....	81
Introduction .....	82
Material and methods .....	84
Results and discussion .....	88
Acknowledgement .....	94
Literature cited .....	95

Chapitre 5. <i>Altered growth of Fusarium oxysporum f. sp. chrysanthemi in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices growing on Daucus carota transformed roots</i> .....	98
Résumé .....	99
Summary .....	100
Introduction .....	101
Materials and Methods .....	103
<i>Ri T-DNA transformed carrot roots and fungal cultures</i> .....	103
<i>Establishment of mycorrhizal colonisation</i> .....	104
<i>Description of the experimental units</i> .....	104
<i>F. o. chrysanthemi inoculation and measurements taken</i> .....	106
<i>Statistical analysis</i> .....	108
Results .....	109
Discussion .....	114
Acknowledgement .....	118
Literature cited .....	119
Chapitre 6. <i>Inhibition of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi in the nonVAM species Dianthus caryophyllus by co-culture with Tagetes patula companion plants colonized by Glomus intraradices</i> .....	126
Résumé .....	127
Summary .....	128
Introduction .....	129
Materials and methods .....	131
<i>Effect of host /non-host plants co-culture on VAM colonization</i> .....	131
<i>Effect of co-culture with a VAM plant on Fusarium wilt of a nonVAM plant</i> .....	132
Results .....	135
<i>Effect of host and non-host plants co-culture on VAM colonization</i> .....	135
<i>Effect of co-culture with a VAM plant on Fusarium wilt of a nonVAM species</i> .....	137
Discussion .....	144
Acknowledgement .....	149
Literature cited .....	150



Chapitre 7. <i>Discussion générale</i> .....	157
Mécanismes liés à une modification de la nutrition. ....	158
Compétition intraracinaire. ....	160
Résistance induite.....	161
Interaction microbiennes directes ou indirectes .....	164
<i>Conclusion générale</i> .....	169
<i>Bibliographie générale</i> .....	172

## Liste des tableaux

Tableau I.	Interactions entre champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules et microorganismes parasites rapportées dans la littérature depuis 1972. ....	11
Tableau II.	Liste des plantes hôtes sur lesquelles sont rapportées des interactions entre un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules et un microorganisme parasite. ....	12
Tableau III.	Liste des microorganismes parasites impliqués dans une interaction avec un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules rapportée dans la littérature. ....	13
Tableau IV.	Liste des espèces de champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules impliqués dans une interaction avec un microorganisme parasite rapportée dans la littérature. ....	14
Tableau V.	Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections du feuillage et des tiges par des champignons pathogènes. ...	16
Tableau VI.	Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections par des bactéries pathogènes. ....	18
Tableau VII.	Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections par des virus. ....	19
Tableau VIII.	Mécanismes probables impliqués dans la réduction des maladies des plantes induite par le champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules. ....	24
Table IX.	Effects of <i>Glomus intraradices</i> and P concentrations in the nutrient solution on the number of propagules of <i>Pythium ultimum</i> in the growth substrate of <i>Tagetes patula</i> . ....	63
Table X.	Effects of P concentrations in nutrient solution, and inoculation with <i>Glomus intraradices</i> or inoculation with <i>Pythium ultimum</i> on the percentage of root length of <i>Tagetes patula</i> bearing: (A) <i>Glomus intraradices</i> vesicles or arbuscules, (B) <i>Pythium ultimum</i> hyphal swellings. ....	64
Table XI.	Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with <i>Glomus intraradices</i> and inoculation with <i>Pythium ultimum</i> on the percentage of root length of <i>Tagetes patula</i> bearing fungal structures. ....	65
Table XII.	Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with <i>Glomus intraradices</i> and inoculation with <i>Pythium ultimum</i> on dry mass of <i>Tagetes patula</i> in a two-plant pot system. ....	67

Table XIII.	Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with <i>Glomus intraradices</i> and inoculation with <i>Pythium ultimum</i> on the root and collar necrosis of <i>Tagetes patula</i> in a two-plant pot system. ....	68
Table XIV.	Hyphal density in the root-fungus (proximal) compartment and in the fungus-only (distal) compartment. The symbiosis was formed between <i>Glomus intraradices</i> and Ri-T DNA transformed <i>Daucus carota</i> roots. ....	92
Table XV.	Spore density in the root-fungus (proximal) compartment and in the fungus-only (distal) compartment. The symbiosis was formed between <i>Glomus intraradices</i> and Ri-T DNA transformed <i>Daucus carota</i> roots. ....	93
Table XVI.	Germination of <i>Fusarium oxysporum chrysanthemi</i> conidia in presence or absence of <i>Glomus intraradices</i> mycelium. ....	110
Table XVII.	Correlations between of <i>F. o. chrysanthemi</i> conidia germination percentage and <i>G. intraradices</i> hyphal or spore densities in each of the four experiments. ....	111
Table XVIII.	Radial growth of <i>F. o. chrysanthemi</i> colonies in presence or absence of <i>G. intraradices</i> mycelium. ....	112
Table XIX.	Relationships between <i>F. o. chrysanthemi</i> growth (colony radius and concentration of newly-formed conidia) and <i>G. intraradices</i> mycelium (hyphal and spore densities). ....	113
Table XX.	Effect of inoculation with the VAM fungus <i>Glomus intraradices</i> on plant dry weights and fungal root colonization of <i>Tagetes patula</i> and <i>Dianthus caryophyllus</i> growing in the same container, at harvest. ....	136
Table XXI.	Effect of co-culture with mycorrhizal or non-mycorrhizal <i>Tagetes patula</i> on the percentage of <i>Dianthus caryophyllus</i> plants showing each class of symptoms caused by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> , 132-days after sowing. ....	140
Table XXII.	Effect of co-culturing <i>Dianthus caryophyllus</i> with VAM or non-VAM <i>Tagetes patula</i> on the number of propagules of <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> recovered in the growth substrate at harvest of the <i>D. caryophyllus</i> plants. ....	141
Table XXIII.	Effect of co-culture of <i>Dianthus caryophyllus</i> plants with VAM or non-VAM <i>Tagetes patula</i> plants on shoot dry weights of both plants at harvest, and on root colonization of <i>D. caryophyllus</i> plants inoculated with the carnation wilt pathogen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> . ...	142
Table XXIV.	Shoot mineral content of <i>Dianthus caryophyllus</i> at harvest, as influenced by co-culture with VAM or non-VAM <i>Tagetes patula</i> . ....	143

## Liste des figures

- Figure 1. Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules sur les maladies des racines causées par les champignons parasites (A) ou par les nématodes parasites (B). ..... 23
- Figure 2. Effects of inoculation with *Glomus intraradices* and *Pythium ultimum* on the percentage of *Tagetes patula* root length bearing fungal structures in a two-plant pot system. Fungal structures are fungal hyphae alone, *G. intraradices* vesicles or arbuscules, and *P. ultimum* hyphal swellings. .... 66
- Figure 3. Diagram of the two-compartment growing system used. Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots were inoculated in the proximal compartment (left side) and only the *G. intraradices* mycelium was allowed to grow in the distal compartment (right side). ..... 87
- Figure 4. Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots (A) The compartmentalized system showing carrot roots growing along with the *G. intraradices* mycelium in the proximal compartment (left side), and the AM fungus hyphae and spores colonizing the rootless distal compartment (right side). (B) Close-up at the dividing wall showing the density of hyphae and spores obtained in the distal compartment. .... 91
- Figure 5. Two-compartment Petri dishes were used as experimental units. A. Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots were inoculated in one compartment and only the *G. intraradices* mycelium was allowed to colonized the second compartment medium. B. In the germination experiments, three cover glass were placed in the rootless compartment and were covered with the growing medium; five drops of the *F. o. chrysanthemi* conidia suspension were inoculated over each cover glass. C. In the mycelium growth and sporulation experiments, no cover glasses were added in the second compartment and two *F. o. chrysanthemi* inoculum disks were transferred in each Petri dish. .... 105
- Figure 6. Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* on the survival of *Dianthus caryophyllus* plants during a 132-days period, as affected by co-culture with mycorrhizal or non-mycorrhizal *Tagetes patula*. .... 139

## Liste des sigles et abréviations

---

AM:	arbuscular mycorrhizal	MVA:	mycorhizien à vésicules et arbuscules
Anova ou		N:	nitrogen
ANOVA:	analysis of variance	NSERC:	National Sciences and Engineering Research Council
ATCC:	American Type Culture Collection	pv. :	pathovar
B:	boron	P :	phosphore ou phosphorus
Ca:	calcium	P :	probability level
cc :	centimètre cube	PAL :	phénylalanine ammonia-lyase
CFU :	colony forming unit	PAR :	photosynthetically active radiation
cm :	centimètre	propag.:	propagules
Cu:	copper	Pu :	<i>Pythium ultimum</i>
cv. :	cultivar	Ri T-DNA:	root inducing transformed deoxyribonucleic acid
DAOM:	Department of Agriculture Ottawa Mycology	R <sup>2</sup> :	determination coefficient
D:	<i>Dianthus</i>	s :	seconde
et al.:	et alia	SD:	standard deviation
EVA :	endomycorhizien à vésicules et arbuscules	sec :	seconde
F:	<i>Fusarium</i>	sp. :	species
Fe:	iron	SSE :	soil saturated extract
f. sp. :	formae speciales	sympt. :	symptômes
g :	gramme	T:	<i>Tagetes</i>
G ou G :	<i>Glomus</i>	VA :	vésicules et arbuscules ou vesicular arbuscular
h :	heure	VAM:	vesicular arbuscular mycorrhizal
ICP:	inductively coupled plasma emission spectrometry	var. :	varietas
K:	potassium	w/v:	weight/volume
L:	litre	W :	watt
m :	mètre	wk :	week
M:	minimal	Zn:	zinc
MANOVA:	multivariate analysis of variance	×:	hybride o times
mg :	milligramme	µg :	microgramme
Mg:	magnesium	µl :	microlitre
min :	minutes	µm :	micromètre
ml ou mL:	millilitre	%:	pourcentage
mm :	millimètre	°:	degré angulaire
mm <sup>2</sup> :	millimètre carré	°C :	degrés Celcius
mM:	millimolaire		
Mn:	manganese		

---

**Note :** Dans le cas des unités de mesure (cc, cm, g, h, mg, etc.), la signification de l'abréviation n'est donnée qu'en français. Cette liste exclut les abréviations de nom de genre utilisées dans le texte lorsque un nom d'organisme revient plusieurs fois dans un même chapitre. Les abréviations d'auteurs suivant un binôme scientifique, à sa première mention dans un chapitre, sont aussi exclues, ainsi que les abréviations utilisées dans un nom commercial lorsque celui-ci est cité.

## Remerciements

Les diverses étapes nécessaires pour mener à terme des études de doctorat forment une tâche très importante, qui ne peut généralement plus, de nos jours, être réalisée sans la collaboration et l'aide d'un grand nombre de personnes.

Je tiens donc à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, le docteur J. André Fortin. Malgré la responsabilité de directeur de l'Institut de recherche en biologie végétale, assumée jusqu'à tout récemment, M. Fortin a toujours su être disponible pour des discussions aussi stimulantes que constructives. Il m'a, en outre, communiqué sa passion et son enthousiasme pour l'étude de ce phénomène fondamental dans la vie des plantes, la symbiose mycorhizienne.

Je remercie aussi mon le docteur Michel Caron pour avoir accepté la co-direction de cette thèse. Son expérience de chercheur gouvernemental pour Agriculture Canada, puis de responsable de programmes de recherche et de développement dans l'industrie privée ont donné une dimension différente et stimulante à nos discussions.

Je tiens à remercier tout particulièrement le docteur Chantal Hamel qui occupait un poste de chercheur post-doctoral dans le laboratoire du Dr. Fortin, au début de ma thèse et qui est maintenant professeure à l'Université McGill. Nos discussions constantes et notre collaboration régulière durant ce travail m'ont apporté une aide précieuse.

Je remercie chaleureusement madame Brigitte Vimard, maintenant étudiante à la maîtrise au laboratoire du Dr. Fortin, pour son assistance technique très appréciée durant une partie importante de mes travaux, mais surtout pour son professionnalisme et sa rigueur incontestable.

Je remercie sincèrement monsieur Stéphane Daigle, statisticien à l'Institut de recherche en biologie végétale, pour toutes ces discussions enrichissantes et ses conseils dans le choix des méthodes et la définition des modèles d'analyse de mes résultats.

Je voudrais aussi remercier, en espérant n'oublier personne, plusieurs collègues qui m'ont tous apporté une aide précieuse durant une partie ou une autre de mes travaux : Dr. Christian Godbout, Dr. Mohamed Lamhamedi, Peter Moutoglis, Xavier Villegas, Line Nantais et Martin Filion qui étaient ou sont toujours chargés de projet, étudiants à la maîtrise ou au doctorat au laboratoire de M. Fortin, pour toutes ces discussions stimulantes et dans plusieurs cas, des commentaires bien appréciés sur mes manuscrits, madame Linda Dumont, assistante botaniste, pour son aide technique professionnelle et monsieur Sylvain Lebeurrier ainsi que plusieurs autres horticulteur du Jardin botanique pour leurs conseils judicieux.

Je ne pourrais terminer sans mentionner le docteur André Bouchard qui fut jusqu'à tout récemment mon patron au Jardin botanique de Montréal ainsi que notre précédent directeur, monsieur Pierre Bourque, qui ont permis et soutenus sans réserve la réalisation de ce projet. Mes collègues botanistes ou professeurs, en particulier messieurs Denis Barabé, Michel Labrecque, nouveau conservateur, Gilles Vincent, nouveau directeur du Jardin botanique, Alain Cogliastro, madame Édith Morin et le docteur Luc Brouillet, pour le climat de travail stimulant durant toutes ces années.

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement madame Sylvie Charest, ma femme, ainsi que Laurence et Julien, mes enfants, à qui j'ai à l'occasion consacré moins de temps que j'aurais voulu, pour leur amour et leur soutien, sans lequel je n'aurais pas pu mener à terme ces études.

## Avant-propos

La rédaction d'une thèse par articles pose la question de la contribution du candidat sur les articles avec coauteurs. Je définirai donc ici ma contribution et celle des coauteurs. Le corps de cette thèse (chapitres 2 à 6) est constitué de cinq articles. Le premier forme un chapitre du livre (avec comité de lecture) *La symbiose mycorhizienne - État des connaissances*, publié par les Éditions Orbis. Les suivants ont été publiés respectivement dans les revues (avec comité de lecture) *Canadian Journal of Phytopathology*, *Mycological Research*, *Mycorrhiza* et *Canadian Journal of Botany*. Les textes sont tels que publiés, sauf pour la mise en page qui a été uniformisée et quelques modifications mineures suggérées par les examinateurs. J'ai écrit la première version des manuscrits et chaque version suivante, tenant compte des commentaires des coauteurs et des correcteurs des revues, jusqu'aux textes finaux publiés. Chaque article a comme coauteur les Drs Fortin et Caron qui sont codirecteurs de cette étude. Leur contribution se situe au niveau du choix du sujet, de l'approbation de l'approche utilisée et de l'encadrement général du travail réalisé. Le Dr C. Hamel, qui est aussi coauteure des cinq articles, occupait un poste de chercheure post-doctoral au laboratoire du Dr. Fortin, au début de ma thèse, sur un sujet analogue. Nous avons collaboré à la compilation et à l'étude initiale de la littérature pertinente. De plus, nos discussions m'ont apporté une aide significative dans la mise au point des protocoles et plus particulièrement dans le choix du système de culture *in vitro* présenté aux chapitres 4 et 5 de la thèse, dont l'idée initiale est issue de ses travaux. Ses commentaires pertinents m'ont aussi apporté une aide appréciée pour l'amélioration des manuscrits. Madame Brigitte Vimard m'a apporté une aide technique très appréciée sur les travaux présentés aux chapitres 4 à 6 et ses commentaires sur les expériences m'ont fourni des éléments de réflexion sur la signification des résultats. Quant à ma contribution à l'ensemble de la thèse, elle a été déterminante dans tous les aspects du travail, de l'analyse de la littérature, au choix de l'approche expérimentale, à la conception des protocoles, à la mise en place et au suivi des expériences, à la récolte des données, à l'analyse statistique et à l'interprétation des résultats et finalement à la rédaction des articles et au suivi du processus éditorial jusqu'à la publication finale.



## Chapitre 1

### *Introduction générale*

Il existe aujourd'hui dans divers pays une tendance forte vers la réduction de l'usage des pesticides. Diverses raisons motivent ce changement, telles l'apparition de résistance aux pesticides de synthèse chez plusieurs microorganismes pathogènes ou ravageurs des cultures, ainsi qu'une prise de conscience collective face aux problèmes de santé liés à l'usage de ces substances. La lutte biologique, bien que connue depuis assez longtemps, constitue dorénavant une voie qui s'impose. Elle est d'ailleurs l'objet d'un grand nombre de travaux de recherches, de publications scientifiques, de colloques et de livres. Baker et Cook (1974) l'ont défini de la façon suivante:

« Biological control is the reduction of inoculum density or disease-producing activities of a pathogen or parasite in its active or dormant state, by one or more organisms, accomplished naturally or through manipulation of the environment, host, or antagonist, or by mass introduction of one or more antagonists. »

Les différentes facettes de la lutte biologique peuvent être regroupées dans trois catégories principales: la réduction de la population du parasite, la protection de la surface de la plante et l'établissement de microorganismes à l'intérieur de la plante (Cook 1982). Ce but peut être atteint par divers moyens dont l'utilisation d'organismes ayant un effet direct ou indirect sur le parasite. Les microorganismes habituels de la rhizosphère sont des candidats de choix pour la lutte biologique contre les maladies d'origine tellurique car ils font déjà partie de l'équilibre entre la plante hôte, le parasite et l'environnement. Les champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) comptent certainement parmi les microorganismes les plus universels à ce chapitre.

L'association entre une plante (*Bryophyta*, *Pteridophyta*, *Gymnospermae*, *Angiospermae*) et un champignon biotrophe obligatoire de l'ordre des *Glomales* (*Zygomycotina*) est généralement mutualiste et se caractérise par la formation de structures typiques, les arbuscules et les vésicules (sauf chez les *Gigasporineae* où seules les arbuscules sont présentes; Morton and Benny 1990). Cette symbiose mycorhizienne

est la plus importante en terme de la proportion des espèces végétales qui en sont partenaires. Environ 95 % des plantes vasculaires appartiennent à des familles considérées comme normalement mycorhiziennes (Smith and Read 1997). Un dépôt volcanique situé près du village de Rhynie, en Écosse, a permis la conservation fossilisée de diverses espèces représentant la végétation d'un marais du début du Dévonien, il y a environ 400 millions d'années (Ingrouille 1992). Plusieurs des plantes fossilisées contiennent des structures fongiques, vésicules et chlamydospores, tellement similaires à celles des champignons EVA d'aujourd'hui qu'on a suggéré qu'il s'agissait déjà de ce type de symbiote (Taylor 1990). Cela a mené à la formulation de l'hypothèse selon laquelle les champignons EVA ont été déterminants dans la colonisation des milieux terrestres par les plantes (Pirozynski 1975). Plus récemment, la découverte d'arbuscules dans les axes d'un *Aglaophyton major* (Rhyniopsida), une des espèces retrouvée sur ce site, est venue confirmer qu'il s'agissait bien de champignons EVA (Remy et al. 1994). Cette observation appuie fortement la possibilité qu'une symbiose mutualiste permettant le transfert de nutriments entre les partenaires, similaire à la symbiose EVA moderne, ait pu déjà exister lorsque les plantes terrestres sont apparues. Par ailleurs, une analyse phylogénétique basée sur la comparaison des séquences obtenues de l'ADN ribosomal de 12 espèces de *Glomales*, a permis d'estimer l'origine des champignons EVA à 353-462 millions d'années, ce qui concorde avec les observations de fossiles (Simon et al. 1993).

Les deux membres de l'association, la plante hôte et le champignon, ont donc évolué de façon conjointe depuis très longtemps en fonction des contraintes posées par leur environnement de vie, vraisemblablement depuis l'origine même des plantes terrestres. L'une de ces contraintes est représentée par la pression constante exercée par les microorganismes parasites qui cherchent à utiliser la ressource énergétique constituée de la plante hôte pour satisfaire leur propres besoins nutritifs. Cela n'est pas à l'avantage ni de la plante hôte ni du champignon EVA qui dépend étroitement de son hôte pour sa survie. Il est donc très probable que certains des moyens mis en oeuvre par la plante pour se protéger contre les attaques des parasites soient influencés par le membre fongique de l'association symbiotique endomycorhizienne. Ce dernier est dans une position privilégiée car il occupe physiquement une portion des racines de son hôte, il en contrôle

partiellement la nutrition et il est aussi en première ligne pour utiliser les photosynthétats qui sont exsudés ou sécrétés par les racines. Mais, comme l'ont souligné Ayers et Adams (1981), si nous ne comprenons pas le mécanisme de contrôle, comment utiliser un moyen de lutte biologique efficacement ?

La meilleure compréhension des effets de la symbiose EVA sur le développement des maladies parasitaires chez les plantes et plus spécifiquement des processus qui interviennent dans l'interaction complexe entre une plante hôte, un champignon EVA et un parasite a donc constitué le thème central de cette étude. Cook et Baker (1983) ont dit à ce sujet: « Explaining the complex effects of one microorganism-plant interaction on a second-order microorganism-plant interaction requires attention to the whole plant. »

Ceci nous a amené à éviter d'aborder le sujet sous un angle précis avant d'avoir analysé en profondeur la littérature disponible. Cette première étape, essentielle dans un cheminement logique de recherche expérimentale, devait nous permettre d'éviter de nous cantonner sur un aspect particulier sans avoir apprécié le problème de façon globale. Cela nous a conduit à réaliser une revue générale et critique de la littérature qui forme le second chapitre de cette thèse. Les mécanismes potentiels mis en évidence comprennent l'augmentation d'assimilation du phosphore par la plante hôte, l'induction de ses mécanismes de résistance, une interaction directe entre le champignon EVA et le parasite, ainsi que l'installation d'une microflore défavorable au parasite sous l'influence de la symbiose (St-Arnaud et al. 1995a). Cette analyse des travaux antérieurs nous a servi à la formulation des hypothèses de travail qui ont été testées dans les expérimentations subséquentes. L'approche retenue a consisté à écarter graduellement les mécanismes non essentiels à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose afin de préciser celui ou ceux qui joueraient un rôle déterminant. L'hypothèse de base était que la symbiose EVA favorise une réduction des maladies racinaires.

Le premier objectif a consisté à examiner la relation entre le niveau de phosphore disponible pour la plante hôte et l'effet du champignon EVA *Glomus intraradices*, sur le développement du parasite racinaire *Pythium ultimum* dans les racines et le substrat de culture du *Tagetes patula*. Nous avons, en outre, vérifié l'effet de deux différents délais d'attente

entre l'inoculation du champignon EVA chez la plante hôte et celle du parasite. Les résultats de cette étude sont présentés au troisième chapitre de la thèse.

Le second objectif était de concevoir un système expérimental nous permettant d'obtenir une phase extramatricielle de champignon EVA axénique, active et en symbiose avec un hôte compatible, mais séparée de l'influence des racines de l'hôte. Le champignon EVA était cultivé en symbiose avec des racines du *Daucus carota* dont l'ADN a été transformé par l'insertion du plasmide Ri de l'*Agrobacterium rhizogenes*, afin d'en permettre la croissance *in vitro* sans portions feuillées. Ce système expérimental a permis la réalisation d'observations inattendues, ainsi que la formulation d'une hypothèse concernant la biologie du champignon. Ces résultats sont présentés au quatrième chapitre. Les retombées de ces observations sont potentiellement élevées pour la fabrication d'inoculum à grande échelle, ce qui a servi de base à l'obtention d'un brevet US.

Le troisième objectif était de vérifier, à l'aide du système expérimental décrit au chapitre quatre, les effets directs d'une phase extramatricielle d'un champignon EVA sur un microorganisme parasite, en l'absence d'interférences étrangères aux organismes étudiés. Le modèle choisi a été formé d'un mycélium du *Glomus intraradices* et du champignon parasite *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. Les résultats de cette étude forment le cinquième chapitre de la thèse.

Le quatrième objectif a consisté à étudier les effets d'un mycélium de champignon EVA sur le développement d'une maladie racinaire, indépendamment de l'installation d'une symbiose entre le champignon EVA et la plante attaquée par le parasite. Cet objectif visait essentiellement à distinguer entre les mécanismes liés à un transfert métabolique entre les partenaires de la symbiose mutualiste et ceux qui sont indépendants de ce processus. L'expérimentation a été conçue de façon à mettre l'accent sur les interactions microbiennes directes et indirectes dans la rhizosphère. Le système expérimental était formé d'une espèce EVA, le *Tagetes patula* et d'une espèce non mycorrhizienne, le *Dianthus caryophyllus*, ainsi que du *Glomus intraradices* et du parasite spécifique à l'espèce non mycorrhizienne, le *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Les résultats de cette étude forment le sixième chapitre de la thèse.

## Bibliographie

- Ayers, W.A. et Adams, P.B. 1981. Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. *Dans* Biological control in crop production, Beltsville symposium in agricultural research. *Édité par* G.C. Papavizas. Allenheld, Totowa, N.J. pp. 91.
- Baker, K.F. et Cook, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman. San Francisco.
- Cook, R. et Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press. St-Paul.
- Cook, R.J. 1982. Progress toward biological control of plant pathogens, with special reference to take-all of wheat. *Agric For Bull* 5: 22.
- Ingrouille, M. 1992. Diversity and evolution of land plants. Chapman & Hall. London.
- Morton, J.B. et Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, with two new families, Acaulosporaceae, and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Pirozynski, K.A. et Malloch, D.W. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153-164.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. et Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841-11843.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. et Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Smith, S.E. et Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. Academic Press. San Diego, London.

- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1995a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. *Dans* La symbiose mycorhizienne - État des connaissances. *Édité par* J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché. Éditions Orbis Publishing, Frelighsburg, Québec. pp. 51-87.
- Taylor, T.N. 1990. Fungal associations in the terrestrial paleoecosystem. *Tree* 5: 21-25.

## *Chapitre 2*

# ***Endomycorhizes VA et sensibilité des plantes aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels<sup>1</sup>***

Ce chapitre analyse en profondeur la littérature scientifique disponible. Cela permet de mettre en évidence les mécanismes potentiellement impliqués dans l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose. Cette analyse des travaux antérieurs a aussi servi à la formulation des hypothèses de travail qui ont été testées dans les expérimentations subséquentes. Comme ce chapitre a été publié en 1995, on y fait parfois référence à des travaux publiés ou en cours qui constituent certains des chapitres de cette thèse.

---

<sup>1</sup> J'ai présenté ces résultats comme conférencier invité à un colloque intitulé *Les symbioses mycorhiziennes*, tenu dans le cadre du 62<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS à Montréal, du 16 au 20 mai 1994 et ils ont aussi été publiés sous forme de chapitre de livre:

St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1994a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels *Dans* Colloque *Les symbioses mycorhiziennes* (Mycorhizes 94), 62<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS, Université du Québec à Montréal.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1995a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels *Dans* La symbiose mycorhizienne - État des connaissances. *Édité par* J.A. Fortin, C. Charest, et Y. Piché. Éditions Orbis Publishing, Frelighsburg, Québec. pp. 51-87.

## Résumé

Au cours de quelques 400 millions d'années de coévolution, une relation très étroite s'est établie entre les plantes vasculaires et les champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA). Ces champignons sont importants en raison de leurs effets bénéfiques sur la croissance et la survie des plantes. Entre autres bénéfiques, les champignons EVA peuvent réduire l'incidence des maladies chez leur plante hôte. Plus de 236 interactions plante hôte-champignon EVA-parasite ont été analysées à partir d'environ 125 articles scientifiques. Bien que les systèmes expérimentaux soient très hétérogènes, il en ressort que les mycoses foliaires et les viroses sont généralement favorisées chez les plantes endomycorhiziennes, alors que les bactérioses ainsi que les mycoses et maladies à nématodes racinaires sont généralement diminuées. Les mécanismes impliqués dans la résistance aux maladies entraînée par l'endomycorhize VA ne sont pas bien définis. Les mécanismes potentiels se regroupent dans les quatre catégories suivantes: 1) amélioration de la nutrition; 2) stimulation des mécanismes de résistance de la plante hôte; 3) interaction directe entre le champignon EVA et le parasite et 4) effet indirect du champignon EVA par une modification quantitative ou qualitative de la microflore de la rhizosphère. Ces mécanismes sont discutés à la lumière des résultats publiés.

**Mots-clés:** mycorhize à vésicules et arbuscules, parasite, maladie, lutte biologique



## Summary

During the course of 400 million years of coevolution, a close relationship has developed between vascular plants and vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. They are important for most vascular plants because of their benefit to plant growth and survival. Among others, VAM fungi can reduce disease symptoms and population of pathogens in their host plants. More than 236 host plant–VAM fungus–pathogen interactions were analysed in approximately 125 scientific papers. Despite the heterogeneity of the experimental systems studied, it appears that viral and foliar fungal diseases are generally favored in VAM plants, while bacterial and fungal root diseases along with nematode damages are generally lowered. The mechanisms involved in VA mycorrhizae-mediated resistance against pathogens are not well understood. The potential mechanisms can be placed in the following four categories: 1) better nutrition; 2) stimulation of the disease resistance mechanisms; 3) direct interaction between VAM fungus and pathogen, and 4) indirect effect of VAM fungus through quantitative and qualitative changes in the rhizosphere microflora of mycorrhizal plants. These mechanisms will be discussed in the light of the published results.

**Keywords:** vesicular-arbuscular mycorrhizae, pathogen, disease, biological control

## Introduction

Depuis environ 400 millions d'années de coévolution (Remy et al. 1994; Simon et al. 1993), une relation étroite s'est établie entre les plantes vasculaires et les champignons endomycorhiziens VA. Ces champignons sont écologiquement importants pour la plupart des plantes vasculaires en raison de leurs effets bénéfiques sur la croissance et la survie des plantes. Entre autres bénéfiques, les champignons endomycorhiziens VA peuvent réduire l'incidence des maladies chez leur plante hôte (Caron 1989a, 1989b; Dehne 1982, 1987b; Garcia-Garrido et Ocampo 1987; Graham 1986; Miller et al. 1986; Perrin 1985, 1990, 1991; Schönbeck 1979; Smith 1988). Cependant, les mécanismes de résistance aux maladies induits par l'endomycorhize VA n'ont pas encore été élucidés.

Environ 125 articles scientifiques ont été publiés sur le sujet depuis 1972 et plus de 236 interactions ont été analysées. La majorité de celles-ci concerne les maladies causées par des champignons (136) ou des nématodes (71) parasites des racines (tableau I). Quatre-vingt-neuf espèces ou cultivars de plantes hôtes (tableau II), plus de 71 microorganismes ou virus pathogènes (tableau III) et environ 20 espèces de champignons endomycorhiziens VA (tableau IV) ont été utilisés dans ces études. Il est cependant difficile d'établir des comparaisons. En effet, il est plutôt rare de voir des études qui impliquent plus d'une espèce de plante hôte. La systématique des Endogonacées étant une discipline encore jeune, l'identité des espèces de champignons endomycorhiziens VA utilisées par les différents chercheurs est parfois douteuse, quand elle n'est pas tout simplement spécifiée comme « inoculat naturel » ou « espèce non identifiée ». De plus, les substrats sont presque toujours différents d'une étude à l'autre, les doses d'inoculat et les méthodes d'inoculation choisies, autant pour le microorganisme parasite que pour le champignon endomycorhizien VA sont rarement comparables, les témoins utilisés ne sont pas toujours semblables, la durée des interactions étudiées varie de quelques semaines à plusieurs mois et, finalement, les paramètres réponses mesurés sont aussi très variables. Les systèmes expérimentaux étudiés sont donc très hétéroclites. Cela rend très difficile la synthèse des résultats. On ne peut donc pas tirer de conclusions définitives à partir de la littérature, on peut cependant en dégager certaines tendances intéressantes.

**Tableau I.** Interactions entre champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules et microorganismes parasites rapportées dans la littérature depuis 1972.

Articles publiés depuis 1972	125
Intéactions rapportées	
Parasites foliaires	12
Parasites racinaires	210
champignons	136
bactéries	3
nématodes	71
Virus	14
Total	236

**Tableau II.** Liste des plantes hôtes sur lesquelles sont rapportées des interactions entre un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules et un microorganisme parasite.

<i>Albizia procera</i>	<i>Echinochloa frumentacea</i>	<i>Phalaris aquatica</i>
<i>Allium cepa</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	<i>P. canariensis</i>
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Festuca arundinacea</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Arachis sp.</i>	<i>Fragaria chiloensis</i>	<i>Piper nigrum</i>
<i>Asparagus officinalis</i>	<i>F. vesca</i>	<i>Pisum sativum</i>
<i>Avena sativa</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus</i>
<i>Brassica napus</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>sinensis</i>
<i>B. oleracea</i>	<i>Gossypium sp.</i>	<i>Prunus cerasifera</i>
<i>Cajanus cajan</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>P. insititia</i>
<i>Capsicum annum</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>P. persica</i>
<i>Carica papaya</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>P. cerasifera</i> × <i>P. munsoniana</i>
<i>Carthamus tinctorius</i>	<i>Hordeum sp.</i>	<i>Secale cereale</i>
<i>Cassia tora</i>	<i>Lablab purpureus</i>	<i>Sorghum bicolor</i>
<i>Cenchrus ciliaris</i>	<i>Lactuca sativa</i>	<i>S. sudanense</i>
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	<i>Linum usirarissimum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Chloris gayana</i>	<i>Liriodendron tulipifera</i>	<i>Tagetes erecta</i>
<i>Chrysanthemum sp.</i>	<i>Lolium multiflorum</i>	<i>T. patula</i>
<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Theobroma cacao</i>
<i>Citrus aurantium</i>	<i>Malus sylvestris</i>	<i>Trifolium subterraneum</i>
<i>C. jambhiri</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Trifolium sp.</i>
<i>C. limon</i>	<i>M. scutellata</i>	× <i>Triticosecale</i>
<i>C. macrophylla</i>	<i>M. truncatula</i>	<i>Triticum aestivum</i>
<i>C. sinensis</i>	<i>Musa cv.</i>	<i>Triticum sp.</i>
<i>Citrus sp.</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Vicia faba</i>
<i>Corchorus ollitorius</i>	<i>Onobrychis viciifolia</i>	<i>V. villosa ssp. dasycarpa</i>
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Ornithopus compressus</i>	<i>Vigna radiata</i>
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	<i>Panicum maximum</i>	<i>V. unguiculata</i>
<i>Cyphomandra betacea</i>	var. <i>trichoglume</i>	<i>Vitis vinifera</i>
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>P. miliaceum</i>	<i>Vitis sp.</i>
<i>Dalbergia sissoo</i>	<i>Persea americana</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Daucus carota</i>	<i>Petunia sp.</i>	

**Tableau III.** Liste des microorganismes parasites impliqués dans une interaction avec un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules rapportée dans la littérature.

<b>Champignons</b>	<i>Macrophomina</i> sp.	<b>Bactéries</b>
<i>Aphanomyces euteiches</i>	<i>Microcyclus ulei</i>	<i>Erwinia carotovora</i>
<i>Bremia lactucae</i>	<i>Olpidium brassicae</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
<i>Cochliobolus sativus</i> (= <i>Bipolaris sorokiniana</i> )	<i>Phoma terrestris</i>	<i>P. syringae</i>
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<b>Virus</b>
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	<i>P. cryptogea</i>	Virus de la feuille rugueuse du citronnier
<i>Cylindrocladium scoparium</i>	<i>P. dreschleri</i>	V. de la mosaïque du tabac
<i>Erysiphe cichoracearum</i>	<i>P. fragariae</i>	V. de la Tristeza des agrumes
<i>E. graminis</i>	<i>P. megasperma</i>	V. de la mosaïque de l'arabette
<i>E. graminis hordei</i>	<i>P. m. glycinea</i>	V. X de la pomme de terre
<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>P. palmivora</i>	
<i>F. monoliforme</i>	<i>P. parasitica</i>	<b>Nématodes</b>
<i>F. oxysporum</i>	<i>Puccinia graminis tritici</i>	<i>Heterodera cajani</i>
<i>F. o. cepa</i>	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	<i>H. glycines</i>
<i>F. o. cucumemmerinum</i>	<i>P. terrestris</i>	<i>H. solanacearum</i>
<i>F. o. lycopersici</i>	<i>Pythium aphanidermatum</i>	<i>Meloidogyne arenaria</i>
<i>F. o. medicaginis</i>	<i>P. irregulare</i>	<i>M. hapla</i>
<i>F. o. vasifectum</i>	<i>P. paroecandrum</i>	<i>M. incognita</i>
<i>F. o. radicle-lycopersici</i>	<i>P. ultimum</i>	<i>M. javanica</i>
<i>F. solani</i>	<i>Pythium</i> sp.	<i>Meloidogyne</i> sp.
<i>F. udum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pratylenchus brachyurus</i>
<i>Gaeumannomyces graminis tritici</i>	<i>Sclerotium rolsfii</i>	<i>P. penetrans</i>
<i>Ganoderma pseudoferreum</i>	<i>Thielaviopsis basicola</i>	<i>P. vulnus</i>
<i>Glomus macrocarpum</i> <sup>1</sup>	<i>Uromyces phaseoli</i>	<i>Radopholus similis</i>
<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>	<i>Rotylenchulus reniformis</i>
	<i>V. dahliae</i>	<i>Tylenchulus semipenetrans</i>

<sup>1</sup> Considéré comme parasite par les auteurs (Modjo et Hendrix 1986; Modjo et al. 1987; Jones et Hendrix 1987).

**Tableau IV.** Liste des espèces de champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules impliqués dans une interaction avec un microorganisme parasite rapportée dans la littérature.

<i>Endogone calospora</i> <sup>1</sup>	<i>G. margarita</i>	<i>G. intraradices</i>
<i>E. macrocarpa</i>	<i>Glomus aggregatum</i>	<i>G. macrocarpum</i>
var. <i>geospora</i>	<i>G. caledonium</i>	<i>G. mosseae</i>
<i>E. mosseae</i>	<i>G. constrictum</i>	<i>G. tenuis</i>
<i>Endogone</i> sp.	<i>G. dimorphicum</i>	<i>Glomus</i> sp.
<i>Gigaspora calospora</i>	<i>G. epigaeus</i>	<i>Sclerocystis sinuosa</i>
<i>G. gigantea</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>Scutellospora heterogama</i>
<i>G. heterogama</i>	<i>G. fasciculatum</i>	

<sup>1</sup> Les noms d'espèces sont ceux utilisés par les auteurs de la publication ayant servi de source; plusieurs d'entre eux sont cependant des synonymes d'autres noms (ex: *Endogone calospora* et *Gigaspora calospora* = *Scutellospora calospora*).

## Maladies foliaires causées par des champignons

Les études de l'effet de l'endomycorhize VA sur une maladie causée par un champignon pathogène des portions aériennes ont démontré, dans 9 cas sur 10 (tableau V), une augmentation des symptômes de la maladie. Feldmann *et al.* (1989) ont plutôt observé une diminution du diamètre des lésions et de la sporulation du *Microcyclus ulei*, l'agent causal de la *South American Leaf Blight* sur l'hévéa (*Hevea brasiliensis*), même si le nombre de lésions n'a pas été influencé; ces auteurs ont suggéré que l'association avec le champignon endomycorhizien pourrait causer des changements physiologiques liés aux mécanismes de résistance de la plante. Schönbeck et Dehne (1979) ont comparé l'effet du *Glomus mosseae* sur plusieurs maladies foliaires de diverses plantes hôtes et constatent que dans tous les cas, la mycorhize augmente les symptômes; pour l'*Uromyces phaseoli* sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la production de pustules sur les feuilles ainsi que le nombre de spores par pustules ont augmenté. Les auteurs suggèrent que le principe responsable de la diminution de la résistance est transmis des racines vers la partie aérienne. Rempel (1989) constate un effet similaire sur le blé tendre (*Triticum aestivum*) colonisé par le *Glomus intraradices* et infecté par le *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* et suggère que l'assimilation accrue de phosphore chez les plantes endomycorhizées expliquerait l'augmentation de la sensibilité à la rouille. Meyer et Dehne (1986) observent aussi un effet semblable sur les symptômes causés par l'*Uromyces phaseoli* sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*) ou du *Bremia lactucae* sur la laitue (*Lactuca sativa*). Cependant, ces auteurs suggèrent que cet effet pourrait être associé à une modification hormonale des plantes hôtes par le champignon endomycorhizien, laquelle aurait pour effet de retarder la sénescence des feuilles.

**Tableau V.** Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections du feuillage et des tiges par des champignons pathogènes.

Plante hôte	Parasite	Champignon EVA	Sympt. <sup>1</sup>	Spores <sup>2</sup>	Source
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Erysiphe cichoracearum</i>	<i>Glomus mosseae</i>	++	nt	Schönbeck et Dehne 1979
<i>Hevea brasiliensis</i>	<i>Microcyclus ulei</i>	<i>G. etunicatum</i>	–	–	Feldmann et al. 1989
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>G. mosseae</i>	++	++	Schönbeck et Dehne 1979
	<i>Erysiphe graminis</i>	<i>G. mosseae</i>	++	++	Schönbeck et Dehne 1979
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>G. mosseae</i>	++	nt	Schönbeck et Dehne 1979
	<i>Bremia lactucae</i>	<i>G. etunicatum</i>	++	nt	Meyer et Dehne 1986
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Uromyces phaseoli</i>	<i>G. mosseae</i>	++	++	Schönbeck et Dehne 1979
		<i>G. constrictum</i>	++	nt	Meyer et Dehne 1986
		<i>G. etunicatum</i>	++	nt	Meyer et Dehne 1986
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Puccinia graminis tritici</i>	<i>G. intraradices</i>	++	nt	Rempel 1989

<sup>1</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur les symptômes de la maladie.

<sup>2</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur l'abondance des spores du champignon parasite sur la plante hôte. Légende: ++: augmentation, --: diminution, nt: non testé.



## Maladies causées par des bactéries

Peu d'interactions impliquant des bactéries pathogènes ont été étudiées (tableau VI). Garcia-Garrido & Ocampo (1988a, 1988b, 1989) ont confronté le *Glomus mosseae* avec deux espèces de bactéries pathogènes de la tomate (*Lycopersicon esculentum*), soit l'*Erwinia carotovora* pv. *carotovora* et le *Pseudomonas syringae*. Dans les deux cas, la colonisation des plantes hôtes par le champignon endomycorhizien a diminué la population du microorganisme pathogène dans la rhizosphère sans égard au contenu en phosphore dans les tissus de la plante, ni au délai entre l'inoculation du parasite et celle du champignon endomycorhizien. Une compensation de la perte en masse sèche a été induite chez la plante hôte infectée par le *Pseudomonas syringae* ou par l'*Erwinia carotovora* lorsque l'inoculation des parasites et celle des champignons endomycorhiziens avaient été faites simultanément.

## Maladies causées par des virus

Dans le cas des infections virales, les résultats, quoique plus variables, sont comparables aux interactions avec les champignons pathogènes foliaires (tableau VII). Daft et Okusanya (1973) ont constaté l'augmentation du nombre de particules de trois virus dans les feuilles et les racines de trois hôtes différents lorsque les plantes sont colonisées par l'*Endogone macrocarpa geospora*. Ils ont obtenu les mêmes résultats en augmentant la quantité de phosphore dans la solution nutritive et suggèrent donc que l'augmentation du nombre de particules virales serait une conséquence de l'absorption accrue de phosphore chez les plantes mycorhizées. Schönbeck et Spengler (1979) ont constaté, par immunofluorescence, que les particules du virus de la mosaïque du tabac sont surtout présentes dans les cellules contenant des arbuscules. Jabaji-Hare et Stobbs (1984) se sont intéressés à la possibilité de transfert du virus entre plantes via le mycélium du symbiote; ils n'ont cependant pas pu constater d'absorption du virus par les arbuscules du champignon endomycorhizien ni de transfert de l'infection entre plantes colonisées.

**Tableau VI.** Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections par des bactéries pathogènes.

Plante hôte	Parasite	Champignon EVA	Sympt. <sup>1</sup>	Propag. <sup>2</sup>	Source
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>Carotovora</i>	<i>Glomus mosseae</i>	nt	–	Garcia-Garrido et Ocampo 1988b
<i>L. esculentum</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	espèce non identifiée	–	nt	Halos et Zorilla 1979
<i>L. esculentum</i>	<i>P. syringae</i>	<i>G. mosseae</i>	–	–	Garcia-Garrido et Ocampo 1988a, 1989

<sup>1</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur les symptômes de la maladie.

<sup>2</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur l'abondance des propagules de la bactérie parasite dans la rhizosphère de la plante hôte. Légende: --: diminution, nt: non testé.

**Tableau VII.** Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sur les infections par des virus.

Plante hôte	Virus	Champignon EVA	Sympt. <sup>1</sup>	Propag. <sup>2</sup>	Source
<i>Citrus aurantium</i>	V. de la feuille rugueuse du citronnier	<i>Glomus etunicatum</i>	-	nt	Nemec et Myhre 1984
	V. de la Tristeza des agrumes	<i>G. etunicatum</i>	-	nt	Nemec et Myhre 1984
<i>C. macrophylla</i>	V. de la Tristeza des agrumes	<i>G. etunicatum</i>	-	nt	Nemec et Myhre 1984
<i>Fragaria chiloensis</i>	V. de la mosaïque de l'arabette	<i>Endogone macrocarpa</i>	nt	++	Daft et Okusanya 1973
<i>Lycopersicon esculentum</i>	V. de la mosaïque du tabac	<i>E. macrocarpa</i>	-	++	Daft et Okusanya 1973
		<i>Glomus sp.</i>	nt	++	Jabaji-Hare et Stobbs 1984
		espèce non identifiée	-	++	Schönbeck et Spengler 1979
	V. X de la pomme de terre	<i>E. macrocarpa</i>	nt	++	Daft et Okusanya 1973
<i>Nicotiana tabacum</i>	V. de la mosaïque du tabac	<i>G. mosseae</i>	++	++	Schönbeck et Dehne 1979
			++	nt	Schönbeck et Schinzer 1972
<i>Petunia sp.</i>	V. de la mosaïque de l'arabette	<i>E. macrocarpa</i>	nt	++	Daft et Okusanya 1973
<i>Solanum tuberosum</i>	virus non identifié	espèce non identifiée	nt	nt	Jalali et Hisar 1991

<sup>1</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur les symptômes de la maladie.

<sup>2</sup> Effet de l'endomycorhize VA sur l'abondance des particules du virus dans les tissus de la plante hôte. Légende: ++ : augmentation, -: pas d'effet, nt: non testé.

## Maladies des racines causées par des champignons

Les tendances dégagées des 136 interactions concernant les maladies des racines causées par des champignons parasites sont illustrées par la figure 1A. Les deux paramètres le plus souvent mesurés par les auteurs de ces études sont l'effet de l'endomycorhize VA sur les symptômes de la maladie ou sur la population du parasite. Environ 65 % des interactions résultent en une diminution des symptômes de la maladie, alors que dans 10 % des cas on rapporte une augmentation et dans 25 %, on ne rapporte aucun effet. La population du parasite dans la rhizosphère ou dans le sol était diminuée dans 42 % des cas, augmentée dans moins de 5 % et non affectée dans près de 53 % des études.

Hwang et al. (1992) ont étudié l'effet de trois inoculats d'endomycorhize VA différents sur le flétrissement causé par le *Verticillium albo-atrum* ou le *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* chez la luzerne (*Medicago sativa*). Le pourcentage de plantes flétries a été significativement réduit chez les plantes endomycorhizées par rapport aux témoins non mycorhizés. La population des deux champignons parasites a aussi été significativement réduite dans la rhizosphère des plantes endomycorhizées par rapport aux témoins. Caron et al. (1986b) ont infecté des plants de tomate (*Lycopersicon esculentum*) avec le *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* quatre semaines avant, simultanément ou quatre semaines après l'inoculation avec le *Glomus intraradices*. Ils ont obtenu une réduction de la nécrose des racines dans tous les cas, y compris lorsque le champignon endomycorhizien avait été inoculé quatre semaines après le parasite.

Les résultats peuvent cependant être plus ambigus. Davis et al. (1978) ont étudié l'effet du *Glomus fasciculatum* sur la pourriture des racines causée par trois espèces de *Phytophthora* sur l'oranger doux (*Citrus sinensis*), l'avocatier (*Persea americana*) et la luzerne (*Medicago sativa*). Dans le cas de la luzerne, ni la croissance des plants endomycorhizés par rapport aux témoins non inoculés, ni l'effet négatif du *Phytophthora megasperma* sur la biomasse des plants n'ont été modifiés par la présence du champignon endomycorhizien. Sur les orangers, seul le *Glomus fasciculatum* a augmenté la biomasse

des plantes et ni le *Phytophthora parasitica*, ni la combinaison parasite/endomycorhize VA n'ont affecté la croissance. Le *Glomus fasciculatum* a par contre augmenté significativement la quantité de racines saines chez les plantes infectées par le champignon parasite. Par contre, les plants d'avocatiers endomycorhizés étaient aussi plus gros que les plants témoins, mais en présence du *Phytophthora cinnamomi*, les plants ayant développé une symbiose endomycorhizienne étaient plus petits que ceux infectés par le champignon parasite seul. La proportion de racines saines a aussi été significativement réduite en présence des deux champignons. Donc, dans ce cas, il semble que le champignon endomycorhizien, ou un microorganisme associé à l'inoculat utilisé, ait augmenté la sensibilité des plantes au champignon parasite.

## **Maladies des racines causées par des nématodes**

Les tendances dégagées des 71 interactions concernant les maladies des racines causées par des nématodes parasites sont illustrées par la figure 1B. Environ 75 % des interactions résultent en une diminution des symptômes de la maladie, alors que dans 8 % des cas on en rapporte une augmentation et, dans 17 % des cas, on ne remarque aucun effet. La population du parasite dans la rhizosphère ou le sol était diminuée dans 46 % des cas, augmentée dans moins de 22 % et n'était pas modifiée dans 32 % des études.

Schenck et al. (1975) ont étudié l'effet de trois champignons endomycorhiziens sur les dommages causés par le *Meloidogyne incognita* sur le soja 'Pickett' (*Glycine max*), un cultivar sensible au parasite. La population de nématodes juvéniles récupérés dans la rhizosphère des plants est plus élevée chez tous les plants endomycorhizés que chez les témoins. Par contre, la biomasse des racines et surtout la récolte de graines sont aussi plus élevées pour les plants endomycorhizés. L'*Endogone macrocarpa* entraîne la plus importante augmentation de productivité accompagnée de la plus faible augmentation de population des nématodes. Les auteurs ont aussi étudié un cultivar résistant à la maladie, le soja 'Forrest'. Les plants endomycorhizés sont encore favorisés malgré l'augmentation

significative du nombre de nématodes dans leur rhizosphère, mais l'espèce mycorhizienne la plus intéressante est ici l'*Endogone heterogama*.

Sikora (1979) rapporte la réduction de la population du *Meloidogyne incognita* chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), l'avoine (*Avena sativa*) et la tomate (*Lycopersicon esculentum*) endomycorhizées et du *Meloidogyne hapla* chez la carotte (*Daucus carota*) endomycorhizée par rapport aux témoins non mycorhizés. Dans cette étude, les larves qui pénétraient et se développaient jusqu'à maturité dans les racines étaient comptées, alors que Schenck et al. (1975), qui ont observé une augmentation des populations, dénombrèrent plutôt les juvéniles dans la rhizosphère des plantes. Ceci illustre la difficulté à comparer des résultats qui ont été établis en utilisant des critères d'évaluation différents.

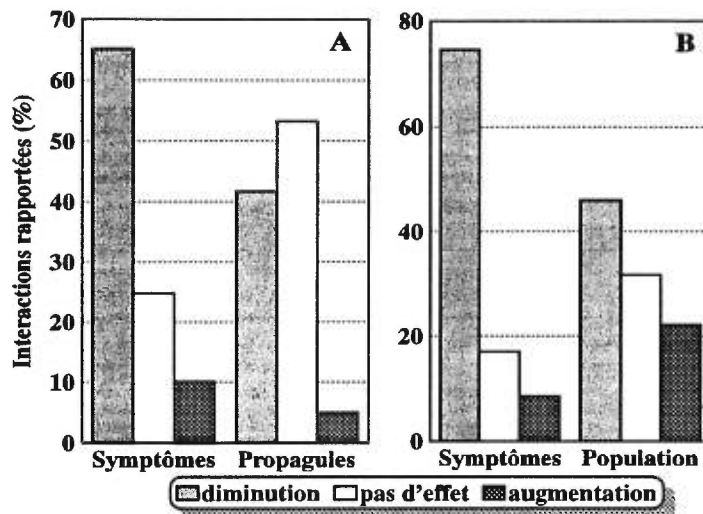
## Mécanismes d'interaction

Aucun mécanisme de contrôle de l'interaction ne ressort clairement de la littérature. Les mécanismes potentiels se regroupent dans les quatre catégories suivantes: 1) Modification de la nutrition; 2) Stimulation des mécanismes de résistance de la plante; 3) Interaction directe entre le champignon endomycorhizien et le parasite; 4) Effet indirect du champignon endomycorhizien par une modification quantitative ou qualitative de la microflore de la rhizosphère (tableau VIII). On trouve dans la littérature des résultats qui supportent ou non la plupart de ces mécanismes possibles.

### MODIFICATION DE LA NUTRITION

Le mécanisme potentiel le plus souvent invoqué concerne l'amélioration de la nutrition des plantes endomycorhizées, particulièrement en ce qui concerne le phosphore (Daft et Okusanya 1973; Davis et Menge 1980; Smith 1988). Comme les parasites réduisent souvent la masse du système racinaire ou sa capacité à absorber les nutriments, la colonisation endomycorhizienne permet aux racines restantes d'être plus efficaces et de compenser en partie ou en totalité la réduction de biomasse provoquée par le parasite. Ce

**Figure 1.** Effet des champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules sur les maladies des racines causées par les champignons parasites (A)<sup>1</sup> ou par les nématodes parasites (B)<sup>2</sup>.



<sup>1</sup> Sources bibliographiques: Bååth et Hayman 1983; Bali et Mukerji 1988; Baltruschat et Schönbeck 1972, 1975; Barnard 1977; Bärtschi et al. 1981; Becker 1976; Bochow et Abou-Shaar 1990; Boyetchko et Tewari 1988, 1990; Caron et al. 1985, 1986a, 1986b, 1986c, 1986d; Chakravarty et Mishra 1986a, 1986b; Chou et Schmitthener 1974; Chulan et al. 1990; Cole et Lim in Dehne 1982; Cole et Mokhtar in Dehne 1982; Davis 1980; Davis et Menge 1980, 1981; Davis et al. 1978, 1979; Dehne 1977, 1987a; Dehne et Schönbeck 1975, 1979a; Giovannetti et al. 1991; Gonçalves et al. 1991a, 1991b; Graham 1988; Graham et Egel 1988; Graham et Menge 1982; Hwang et al. 1992, 1993; Idczak et al. 1991; Iqbal et Mahmood 1986; Iqbal et al. 1987a, 1987b, 1988a, 1988b; Jalali et Hisar 1991; Jones et Hendrix 1987; Kaye et al. 1984; Khadge et al. 1990; Krishna et Bagyaraj 1983; Mahmood et Iqbal 1982; Mahmood et Khurshid 1988; Mataré et Hattingh 1978; McGraw 1983; McGraw et Schenck 1981; Modjo et Hendrix 1986; Modjo et al. 1987; Nemeč 1979; Ramaraj et al. 1988; Ramirez 1974; Rempel 1989; Rosendahl 1985; Ross 1972; Safir 1968; Schenck et al. 1977; Schönbeck et Dehne 1977, 1979; St-Arnaud et al. 1994b; Stewart et Pflieger 1977; Sundaresan et al. 1993; Thompson et Wildermuth 1989; Tosi et al. 1988; Traquair et Pohlman 1990; Wacker et al. 1990; Whatley et Gerdemann 1981; Zambolim et Schenck 1981, 1983.

<sup>2</sup> Sources bibliographiques: Atilano et al. 1976; Baghel et al. 1990; Bagyaraj et al. 1979; Camprubi et al. 1993; Cooper et Grandison 1987; Fox et Spasoff 1972; Francl et Dropkin 1985; Hussey et Roncadori 1977, 1978, 1982; Jain et Sethi 1987; Jalali et Hisar 1991; Kellam et Schenck 1980; O'Bannon et al. 1979; O'Bannon et Nemeč 1979; Orolfo 1990; Pinochet et al. 1993; Priestel 1980; Roncadori et Hussey 1977; Salem et al. 1984; Schenck et al. 1975; Schenck et Kinlock 1974; Sikora 1979; Sikora et Schönbeck 1975; Singh et al. 1990; Sivaprasad et al. 1990; Smith et al. 1986; Subhashini 1990; Thomson-Cason et al. 1983; Umesh et al. 1988.

**Tableau VIII.** Mécanismes probables impliqués dans la réduction des maladies des plantes induite par le champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules (EVA).

- 
- **Modification de la nutrition**
    - amélioration de la vigueur générale des plantes (compensation)
    - altération de l'exsudation (attraction des parasites)
  
  - **Mécanismes de résistance de la plante**
    - barrières physiques (lignine, callose, etc.)
    - substances inhibitrices (phénols, phytoalexines, etc.)
    - prémunition
  
  - **Interaction directe champignon EVA - parasite**
    - racines (intérieur / extérieur)
      - compétition pour les sites de colonisation
      - compétition pour des nutriments
      - antibiose
    - substrat (rhizoplan / rhizosphère / mycorhizosphère)
      - antibiose
      - compétition pour des minéraux
      - libération de substances biologiquement actives
  
  - **Effet indirect champignon EVA - microflore - parasite**
    - (interne / rhizoplan / rhizosphère / mycorhizosphère)
      - compétition
      - antibiose
      - hyperparasitisme
-



mécanisme correspond à l'effet du champignon endomycorhizien sur la nutrition des plantes hôtes mais ne permet pas d'expliquer un bon nombre d'interactions ou on observe, par exemple, une réduction de la population d'un parasite indépendamment du statut nutritif ou de la biomasse de la plante hôte.

Une autre conséquence de l'absorption accrue de phosphore concerne l'exsudation racinaire. On sait que la quantité et la qualité des exsudats sont modifiés selon que la plante absorbe plus ou moins de phosphore (Schwab et al. 1983) et que les exsudats jouent aussi un rôle important dans la germination des propagules d'un champignon parasite ou dans l'attraction des racines pour les nématodes. Selon Graham et Menge (1982), une réduction de l'exsudation racinaire consécutive à l'augmentation du contenu en phosphore des racines endomycorhizées serait le mécanisme par lequel l'activité du *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* serait réduite chez le blé (*Triticum aestivum*) endomycorhizé.

Les travaux de Menge et collaborateurs (Davis and Menge 1980; Davis et al. 1978, 1979; Graham and Menge 1982) ont fortement contribué à suggérer que l'effet des champignons endomycorhiziens sur les maladies était uniquement dû au phosphore. Par exemple, Davis et Menge (1980) ont étudié l'effet du *Phytophthora parasitica* et du phosphore sur des orangers doux (*Citrus sinensis*) colonisés ou non par le *Glomus fasciculatus*. La biomasse des plants a été augmentée par le *Glomus fasciculatus* au niveau faible de phosphore (<15 mg P/g sol) et les plants colonisés par les deux champignons ont eu une meilleure croissance que ceux qui n'étaient infectés que par le champignon parasite. À un niveau intermédiaire de phosphore (>56 mg/g sol), les plants endomycorhizés avaient encore une biomasse plus importante que les témoins non colonisés, mais les plants colonisés par les deux champignons étaient semblables à ceux qui n'étaient infectés par le champignon parasite seul. Au niveau élevé de phosphore (>300 mg/g sol), il n'y avait plus de stimulation de croissance par le champignon endomycorhizien et les plants colonisés par les deux champignons étaient significativement plus petits que ceux qui n'étaient infectés que par le champignon parasite. L'effet sur les symptômes de la maladie sur les racines était semblable. Au

niveau faible de phosphore, le champignon endomycorhizien a partiellement protégé les racines alors qu'aux niveaux intermédiaire ou élevé de phosphore, la proportion de racines saines a été la même, que les plants soient endomycorhizés ou non, et les racines des plantes infectées par le champignon parasite seul étaient aussi plus saines qu'au niveau de phosphore le plus faible. Ces auteurs en ont déduit que le seul mécanisme impliqué dans l'interaction entre le champignon endomycorhizien et le champignon parasite est lié à l'augmentation de l'assimilation du phosphore chez la plante hôte. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude portant sur le blé (*Triticum aestivum*) atteint de piétin-échaudage (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) (Davis et al. 1979). Par contre, dans une étude portant sur le coton (*Gossypium hirsutum*) atteint de flétrissement verticillien (*Verticillium dahliae*) (Graham and Menge 1982), les plants mycorhizés étaient plus sensibles à la maladie dans un sol faible en phosphore (20 µg P/g sol) mais la présence du champignon endomycorhizien n'avait plus d'effet sur la maladie à un niveau de phosphore plus élevé (300 µg P/g sol).

Caron et al. (1986c) ont étudié l'effet du *Glomus intraradices* sur la nécrose des racines de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) causée par un *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, en fonction de plusieurs niveaux de phosphore disponible dans la solution nutritive des plants. Dans cette étude, le champignon endomycorhizien n'avait pas d'effet par lui-même sur la biomasse des plants, mais autant les symptômes de nécrose racinaire que la population du champignon parasite dans le sol ont été significativement réduits chez les plants endomycorhizés par rapport aux plants inoculés avec le champignon parasite seul et cet effet a été totalement indépendant du niveau de phosphore disponible.

Jusqu'à tout récemment, le travail de Caron et al. (1986c) était le seul qui démontrait de façon nette une absence de corrélation entre le phosphore et la protection contre une maladie conférée par l'endomycorhize VA et, par le fait même, ses conclusions en étaient parfois marginalisées (Smith 1988). Nous avons donc étudié un autre système expérimental composé du *Glomus intraradices*, de la tagète (*Tagetes patula*) et du *Pythium ultimum* dans une expérience comportant trois niveaux de phosphore

(St-Arnaud et al. 1994b). La colonisation endomycorhizienne a eu comme effet de réduire dans une proportion de 10 pour 1 les propagules du *Pythium ultimum* dans le substrat. L'importance de l'inhibition du *Pythium ultimum* a été la même quel que soit le niveau de phosphore et celui-ci n'a pas eu d'effet significatif sur la population du parasite. La proportion des racines contenant des arbuscules ou des vésicules du *Glomus intraradices*, ou des renflements hyphiques caractéristiques du *Pythium ultimum* a été évaluée. Dans chaque pot, un premier plant a permis au *Glomus intraradices* de s'établir dans le substrat. Un second plant, ayant été introduit cinq semaines plus tard, était exposé au *Glomus intraradices* et au *Pythium ultimum* presque simultanément, à un stade où il était très vulnérable au champignon parasite. Les structures caractéristiques du *Glomus intraradices* ont été significativement réduites par les niveaux élevés de phosphore mais n'ont pas été affectées par la présence du champignon parasite. Par contre, l'abondance des renflements hyphiques du *Pythium ultimum* a été significativement réduite par l'endomycorhize VA chez les jeunes plants. Cela confirme que l'assimilation accrue de phosphore ne peut pas toujours expliquer l'inhibition du champignon parasite. Comme cette inhibition se manifeste aussi à des niveaux de colonisation très faibles et même lorsque les plants sont exposés simultanément au parasite et au champignon endomycorhizien, cela suggère, comme mécanismes possibles d'interaction, soit la stimulation des mécanismes de résistance chez les plants endomycorhizés, soit une interaction directe ou indirecte dans les racines ou le substrat des plants.

#### STIMULATION DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DE LA PLANTE

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'effet des champignons endomycorhiziens VA sur les mécanismes de résistance de la plante hôte. Certains résultats démontrent la synthèse accrue de chitinases chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*), le pois (*Pisum sativum*) et le maïs (*Zea mays*) colonisés par le *Glomus mosseae* (Dehne et al. 1978). On observe aussi une accélération du métabolisme des phénols et la lignification accrue des racines chez la tomate et le concombre (*Cucumis sativus*) endomycorhizés (Dehne et Schönbeck 1979b), une augmentation de la synthèse de phytoalexines chez la féverole

(*Vigna unguiculata*) colonisée par le *Glomus fasciculatum* corrélée avec une augmentation de la résistance à la fusariose (Sundaresan et al. 1993) et une synthèse accrue de certains phénols liés aux parois chez l'oignon (*Allium cepa*) (Grandmaison et al. 1993).

Par contre, d'autres chercheurs obtiennent des résultats qui semblent indiquer que les mécanismes de résistance sont peu ou pas du tout stimulés par l'endomycorhize VA. Par exemple, Dumas et al. (1989, 1990) et Gianinazzi-Pearson et al. (1992) rapportent que seulement des quantités extrêmement faibles de protéines PR-b1 sont produites par les racines de tabac (*Nicotiana tabacum*) et d'oignon (*Allium cepa*) colonisées par les *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum* ainsi que par les racines de tabac colonisées par les *Glomus monosporum*, *Acaulospora laevis*, *Sculetospora pellucida* et *Glomus* sp. On signale aussi que peu ou pas de phytoalexines sont synthétisées chez le soja lors de la colonisation endomycorhizienne (Morandi et al. 1984; Wyss et al. 1989, 1992). Spanu et Bonfante-Fasolo (1988) ont observé une stimulation de l'activité des peroxydases chez le poireau (*Allium porrum*) en début de colonisation, mais un retour au niveau initial par la suite, ce qui suggère l'idée que les parois cellulaires ne sont pas renforcées. Codignola et al. (1989) n'observent pas de synthèse accrue de phénols chez le poireau (*Allium porrum*) ou le gingko (*Gingko biloba*) lors de la colonisation endomycorhizienne. Une suppression générale des mécanismes de résistance du pois (*Pisum sativum*; endochitinases, beta-1,3-endoglucanases et chalcone isomérase) a été observée durant la colonisation endomycorhizienne (Lambais and Mehdy 1993). Enfin, on rapporte la synthèse de chitinases différentes chez le tabac (*Nicotiana tabacum*) selon que la plante est colonisée par un champignon parasite, le *Chalara elegans* ou par trois espèces de champignons endomycorhiziens, les *Glomus versiforme*, *Glomus intraradices* et *Glomus fasciculatum* (Dumas-Gaudot et al. 1992).

Certains chercheurs ont aussi obtenu des résultats plus équivoques tel que la stimulation de la production de cyanoglucosides chez l'hévéa (*Hevea brasiliensis*) par une souche du *Glomus etunicatum* qui provoquait aussi une diminution du contenu en scopoletine (phytoalexine), alors qu'une autre souche de la même espèce n'avait pas

d'effet (Lieberei and Feldmann 1989). Les niveaux d'activité de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL; synthèse des phénylpropanoïdes) et de la chalcone synthétase (enzyme impliquée dans la synthèse des phytoalexines) sont légèrement augmentés au début de la colonisation endomycorhizienne chez la luzerne (*Medicago sativa*) alors que l'isoflavone réductase, la dernière enzyme dans la voie de biosynthèse de la médicarpine, une des principales phytoalexines de la luzerne, est inhibée (Harrison and Dixon 1993). Des résultats semblables, comme l'induction d'une réaction de défense non spécifique (PAL, chalcone isomérase, chitinase) en début de colonisation endomycorhizienne, suivie d'une suppression, ont aussi été observés chez la luzerne par Volpin et al. (1994).

Tout ces travaux ont été réalisés sur des plantes exposées au champignon endomycorhizien seul, sans que les auteurs n'analysent ce qui se produit chez une plante colonisée d'abord par le champignon endomycorhizien VA et ensuite par un microorganisme parasite. C'est ce qu'ont fait récemment Benhamou et al. (1994) en utilisant un système *in vitro*. Des racines de carotte (*Daucus carota*) transformées par l'*Agrobacterium rhizogenes* et qui étaient colonisées ou non par le *Glomus intraradices* ont été exposées à l'attaque par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. Dans les racines non mycorhizées, le champignon parasite peut être observé en abondance dans les cellules du cortex ainsi que dans les faisceaux vasculaires; les parois cellulaires sont fortement endommagées. Dans une racine préalablement colonisée par le *Glomus intraradices*, le *Fusarium oxysporum* est limité aux cellules du cortex et on observe des réactions typiques de résistance, telles que la formation de protubérances ressemblant à des papilles au point de pénétration du champignon parasite. On observe aussi un changement considérable de morphologie des hyphes du parasite et l'apparition de globules formés de matériel opaque aux électrons. Dans le cortex interne, on observe fréquemment un dépôt de matériel amorphe et opaque aux électrons le long des parois de l'hôte et ce matériel entoure les hyphes du *Fusarium oxysporum*. Cette réaction a entraîné divers degrés d'altération des parois et du cytoplasme des hyphes du *Fusarium oxysporum* allant jusqu'à la rupture des parois du champignon parasite. Dans les racines colonisées par le *Glomus intraradices* seul, on n'observe que la présence occasionnelle de globules opaques aux électrons dans le cytoplasme des cellules. Ces résultats démontrent

qu'il y a une stimulation des mécanismes de résistance par le champignon endomycorhizien, suivie immédiatement d'un blocage de la cascade de réactions par un mécanisme inconnu. La réactivation des mécanismes de résistance ne s'est produite que plus tard, lors de la perception d'un signal apporté par le *Fusarium oxysporum*. Les racines ont alors été à même de réagir plus rapidement et plus fortement à l'agression. Comme ces résultats ont été obtenus avec un système très artificiel, ils demandent à être confirmés dans des conditions naturelles de culture. Cependant, cela indique que la prémunition des plantes endomycorhizées par leur symbiote fongique est une hypothèse très intéressante pour expliquer au moins une partie de la résistance des plantes induite par les champignons endomycorhiziens.

#### **EFFET INDIRECT PAR MODIFICATION DE LA MICROFLORE**

Il a été démontré qu'une augmentation de l'assimilation du phosphore diminue significativement la concentration des glucides, des acides carboxyliques et des acides aminés dans les exsudats racinaires du sorgho (*Sorghum vulgare*). La comparaison du taux d'exsudation des racines avec la croissance d'un champignon endomycorhizien suggère que ce dernier est capable de modifier la perméabilité membranaire afin d'accélérer l'exsudation (Schwab et al. 1983). Or cette modification de la disponibilité des substances nutritives dans l'environnement racinaire modifie vraisemblablement l'équilibre de la microflore de la rhizosphère. On sait aussi que le réseau d'hyphes du champignon endomycorhizien est impliqué dans l'agrégation des sols (Sutton et Sheppard 1976; Thomas et al. 1993). Bagyaraj (1984) pense que ce milieu favorise la croissance d'une microflore particulière. Linderman et Paulitz (1990) ont suggéré que certains microorganismes du sol résidant sur, ou autour, des hyphes des champignons endomycorhiziens puissent voir leur distribution spatiale fortement influencée par ces derniers.

Des changements qualitatifs et quantitatifs de microorganismes ont été remarqués dans l'environnement racinaire des plantes endomycorhizées (Ames et al. 1984; Bagyaraj et Menge 1978; Meyer et Linderman 1986b; Secilia et Bagyaraj 1987). Par exemple Meyer et Linderman (1986b) ont observé que le nombre de bactéries totales était significativement plus élevé sur la surface des racines du maïs (*Zea mays*) ou du trèfle (*Trifolium*

*subterraneum*) endomycorhizés que chez les témoins, mais qu'un phénomène semblable ne se retrouve pas dans la rhizosphère des mêmes plantes. Dans une tentative d'identification des groupes de bactéries responsables de ces différences, ces auteurs ont observé, entre autres, que le *Pseudomonas fluorescens* était plus abondant sur le rhizoplan ainsi que dans la rhizosphère du maïs endomycorhizé. Ils ont aussi montré que le *Phytophthora cinnamomi* forme significativement moins de sporanges et de zoospores dans un extrait aqueux de la rhizosphère de plantes endomycorhizées que dans un extrait provenant de plantes non colonisées.

#### **INTERACTION DIRECTE ENTRE LE CHAMPIGNON ENDOMYCORHIZIEN ET LE MICROORGANISME PARASITE**

Ce type d'interaction a été postulé à diverses reprises (Caron et al. 1985, 1986c; Garcia-Garrido et Ocampo 1988b, 1989; Gerdemann 1975) mais il n'en existe aucune démonstration directe publiée jusqu'à maintenant. Une des principales difficultés réside dans le fait qu'on ne peut pas cultiver le champignon endomycorhizien sans la présence d'une plante hôte et qu'il est donc toujours difficile d'isoler l'effet du champignon de l'effet des racines.

Afin de contourner le problème, un système expérimental dans lequel l'interaction entre le champignon endomycorhizien VA et le microorganisme parasite est isolée des interférences créées par les racines de l'hôte et les autres microorganismes de la rhizosphère était requis. Un système de culture monoxénique *in vitro* de champignon endomycorhizien VA sur des racines de carotte (*Daucus carota*) transformées génétiquement, développé par Bécard et Fortin (1988), a donc été modifié en ce sens par l'utilisation d'une boîte de Pétri à deux compartiments. Le premier compartiment contenait le milieu permettant la culture des racines endomycorhizées et l'autre contenait le même milieu moins le sucre, de façon à ne pas favoriser une croissance trop rapide du champignon parasite à examiner. Le système permet de n'avoir que le mycélium et les spores du champignon endomycorhizien du côté sans sucre. De cette façon, nous avons pu démontrer que la germination des conidies d'un isolat du *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* est doublée en présence du *Glomus intraradices* par rapport aux témoins

dont les boîtes ne contenaient que des racines non colonisées (St-Arnaud et al. 1995b). La croissance radiale des colonies du *Fusarium oxysporum chrysanthemi* durant cinq jours a aussi été faiblement mais significativement stimulée en présence du *Glomus intraradices*. Aucune corrélation n'a été trouvée entre l'augmentation de croissance des colonies du champignon parasite et la densité des hyphes ou des spores du *Glomus intraradices*. La sporulation du *Fusarium oxysporum chrysanthemi* n'a pas non plus été modifiée par la présence du champignon endomycorhizien. Cependant, une corrélation négative a été trouvée entre la production de conidies par le *Fusarium oxysporum chrysanthemi* et la densité des hyphes ou des spores du *Glomus intraradices*. Il pourrait sembler curieux d'obtenir une stimulation d'un parasite par le champignon endomycorhizien alors que l'on cherche un mécanisme d'inhibition de la maladie. Ces résultats peuvent être interprétés de deux façons. On peut penser que, dans un système naturel ou agricole, plusieurs microorganismes puissent être stimulés de la même façon et l'équilibre des microorganismes puissent en être alors modifié dans un sens défavorable au parasite. Ceci rejoint les mécanismes d'effet indirect par modification de la microflore. Une deuxième interprétation pourrait être proposée: si, en conditions naturelles, la germination des propagules du parasite est stimulée à proximité des hyphes du champignon endomycorhizien, la phase extramatricielle de ce dernier étant beaucoup plus étendue que le système racinaire, les spores du champignon parasite germeraient souvent trop loin d'une racine compatible et seraient alors exposées à l'épuisement inutile de leurs réserves et à la dégradation par l'activité des autres microorganismes du sol.

Évidemment, il reste à démontrer que cette stimulation n'est pas un cas exceptionnel et, ensuite, à tester cette hypothèse dans un système plus naturel. Un autre résultat intéressant, issu de cette expérience, est qu'aucune inhibition n'ait été observée entre les deux microorganismes, alors que la production de substances inhibitrices avait parfois été envisagée comme mécanisme potentiel (Caron et al. 1986c; Garcia-Garrido et Ocampo 1989). Il faut encore ici signaler qu'il s'agit d'un système *in vitro* et que le résultat pourrait être différent dans un système plus naturel.



## Conclusion

Plusieurs mécanismes contribuent vraisemblablement à la réduction des maladies chez les plantes endomycorhizées. Des effets de la symbiose, tels l'amélioration de la nutrition, la réduction des stress, la stimulation des mécanismes de résistance, la modification de la microflore et même, peut être, des effets directs d'interaction sont probablement tous impliqués. L'action respective des divers mécanismes varie probablement selon la combinaison plante hôte-champignon endomycorhizien-micro-organisme parasite et selon les conditions environnementales (propriétés physico-chimiques du substrat, température, lumière, humidité, etc.).

De façon courante, l'inoculat endomycorhizien utilisé pour les études d'interaction avec le développement d'une maladie est conservé et multiplié sur des plantes cultivées en serre ou, dans le meilleur des cas, en cabinet de croissance. La possibilité que cet inoculat transporte aussi un microorganisme inhibiteur du champignon endomycorhizien ou même un microorganisme parasite de la plante hôte est donc toujours un risque. L'augmentation de la sensibilité à certaines maladies, rapportée par quelques auteurs, pourrait ainsi s'expliquer, tout au moins en partie, par la qualité des inoculats endomycorhiziens utilisés.

La capacité des champignons endomycorhiziens VA à entraîner une diminution des maladies est peut être un facteur aussi important pour la plante que l'amélioration de l'assimilation des nutriments. Pour utiliser efficacement cet avantage dans un système agricole, on devra prendre en considération d'autres paramètres très importants, tels la variabilité intra- ou interspécifique chez les champignons endomycorhiziens VA, très mal connue à ce jour, ainsi que les conditions et la séquence d'inoculation optimales pour une situation particulière de même que les conditions d'interaction qui détermineront souvent le succès ou l'échec d'un moyen de lutte biologique.

## **Remerciements**

Nous désirons remercier Brigitte Vimard pour sa contribution significative à certaines expériences, lesquelles ont été supporté par une subvention du CRSNG accordée à J. André Fortin, ainsi que Linda Dumont pour son aide technique.

## Bibliographie

- Ames, R. N., Reid, C. P. P. et Ingham, E. R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 96: 555-563.
- Atilano, R. A., Rich, J. R., Ferris, H. et Menge, J. A. 1976. *Meloidogyne arenaria* on endomycorrhizal grape (*Vitis vinifera*) rootings. *J. Nematol.* 8: 278-279.
- Bååth, E. et Hayman, D. S. 1983. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae XIV. Interactions with *Verticillium* wilt on tomato plants. *New Phytol.* 95: 419-426.
- Baghel, P. P. S., Bhatti, D. S. et Jalali, B. L. 1990. Interaction of VA mycorrhizal fungus and *Tylenchulus semipenetrans* on *Citrus*. *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février 1990. *Éditeurs*: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 118-119.
- Bagyaraj, D. J. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi *Dans* VA mycorrhiza. *Éditeurs*: L. L. Conway, D. Powell et D. J. Bagyaraj. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 131-153.
- Bagyaraj, D. J., Manjunath, A. et Reddy, D. D. R. 1979. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhiza with root knot nematodes in tomato. *Plant Soil* 51: 397-403.
- Bagyaraj, D. J. et Menge, J. A. 1978. Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora. *New Phytol.* 80: 567-573.
- Bali, M. et Mukerji, K. G. 1988. Effect of VAM fungi on *Fusarium* wilt of cotton and jute *Dans* Proceedings of the Asiatic Conference on Mycorrhizae, 29-31 janvier 1988. *Éditeurs*: A. Mahadevan, N. Raman et K. Natarajan. Madras, India. pp. 233-234.
- Baltruschat, H. et Schönbeck, F. 1972. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf die Chalmydosporen Bildung von *Thielaviopsis basicola* in Tabakwurzeln. *Phytopathol. Z.* 74: 358-361.

- Baltruschat, H. et Schönbeck, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathol. Z.* 84: 172-188.
- Barnard, E. L. 1977. The mycorrhizal biology of *Liriodendron tulipifera* and its relationship to *Cylindrocladium* root rot. Thèse de PhD, Duke Univ., North Carolina.
- Bärtschi, H., Gianinazzi-Pearson, V. et Vegh, I. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathol. Z.* 102: 213-218.
- Bécard, G. et Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Becker, W. N. 1976. Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizae and their resistance to *Pyrenochaeta terrestris*. Thèse de PhD, Univ. Illinois.
- Benhamou, N., Fortin, J. A., Hamel, C., St-Arnaud, M. et Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84: 958-968.
- Bochow, H. et Abou-Shaar, M. 1990. On the phytosanitary effect of VA-mycorrhiza in tomatoes to the corky-root disease. *Zentralbl. Mikrobiol.* 145: 171-176.
- Boyetchko, S. M. et Tewari, J. P. 1988. The effect of VA mycorrhizal fungi on infection by *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Can. J. Plant Pathol.* 10: 361.
- Boyetchko, S. M. et Tewari, J. P. 1990. Effect of phosphorus and VA mycorrhizal fungi on common root rot of barley. *Dans Innovation and integration. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae, 5-8 septembre 1990. Jackson, Wyoming.* p. 33.
- Camprubi, A., Pinochet, J., Calvet, C. et Estaun, V. 1993. Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of three plum rootstocks. *Plant Soil* 153: 223-229.

- Caron, M. 1989. Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 177-179.
- Caron, M. 1989. Problématique de l'utilisation des champignons endomycorrhiziens comme agents de lutte biologique. *Phytoprotection* 70: 43-49.
- Caron, M., Fortin, J. A. et Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. *Plant Soil* 87: 233-239.
- Caron, M., Fortin, J. A. et Richard, C. 1986. Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes over a twelve-week period. *Can. J. Bot.* 64: 552-556.
- Caron, M., Fortin, J. A. et Richard, C. 1986. Effect of inoculation sequence on the interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 12-16.
- Caron, M., Fortin, J. A. et Richard, C. 1986. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on Fusarium root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.
- Caron, M., Richard, C. et Fortin, J. A. 1986. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on Fusarium crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 67: 15-19.
- Chakravarty, P. et Mishra, R. R. 1986. Influence of endotrophic mycorrhizae on the fusarial wilt of *Cassia tora* L. *J. Phytopathol. (Berl.)* 115: 130-133.
- Chakravarty, P. et Mishra, R. R. 1986. The influence of VA mycorrhizae on the wilting of *Albizia procera* and *Dalbergia sissoo*. *Eur. J. For. Pathol.* 16: 91-97.
- Chou, L. C. et Schmitthener, A. F. 1974. Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mosseae* on soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Dis. Rep.* 58: 221-225.

- Chulan, A. H., Shaji, G. T. et Christine, Z. A. 1990. Interactions of mycorrhizal fungi with root pathogen of cocoa. *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février 1990. *Éditeurs*: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar India. pp. 78-79.
- Codignola, A., Verotta, L., Spanu, P., Maffei, M., Scannerini, S. et Bonfante-Fasolo, P. 1989. Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 112: 221-228.
- Cole and Lim *dans* Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Cole and Mokhtar *dans* Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Cooper, K. M. et Grandison, G. S. 1987. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on infection of tamarillo (*Cyphomandra betacea*) by *Meloidogyne incognita* in fumigated soil. *Plant Dis.* 71: 1101-1107.
- Daft, M. J. et Okusanya, B. O. 1973. Effect of Endogone mycorrhizae on plant growth. V. Influence of infection on the multiplication of virus in tomato, petunia and strawberry. *New Phytol.* 72: 975-983.
- Davis, R. M. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* on *Thielaviopsis basicola* root rot of Citrus. *Plant Dis.* 64: 839-840.
- Davis, R. M. et Menge, J. A. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of Citrus. *Phytopathology* 70: 447-452.
- Davis, R. M. et Menge, J. A. 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Citrus. *New Phytol.* 87: 705-715.
- Davis, R. M., Menge, J. A. et Erwin, D. C. 1979. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456.

- Davis, R. M., Menge, J. A. et Zentmyer, G. A. 1978. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on Phytophthora root rot of three crop plants. *Phytopathology* 68: 1614-1617.
- Dehne, H.-W. 1977. Untersuchungen über den Einfluss der endotrophen Mycorrhiza auf die Fusarium-Welke an Tomate und Gurke. Thèse de PhD, Univ. Bonn, Germany.
- Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Dehne, H.-W. 1987. VA mycorrhizae and plant health. *Dans Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities. Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. Éditeurs: D. M. Sylvia, L. L. Hung et J. H. Graham. Gainesville FL. pp. 192.*
- Dehne, H.-W. 1987. Zur Nutzung der Mykorrhiza als Antistressfaktor. *Angew Botanik* 61: 135-143.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1975. The influence of endotrophic mycorrhizae on the Fusarium wilt of tomato. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 82: 630-632.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1979. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten I. Ausbreitung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Tomaten. *Phytopathol. Z.* 95: 105-110.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1979. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten II. Phenolstoffwechsel und Lignifizierung. *Phytopathol. Z.* 95: 210-216.
- Dehne, H.-W., Schönbeck, F. et Baltruschat, H. 1978. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten 3. Chitinase-aktivität und Ornithinzyklus. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 85: 666-678.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi, S. 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 111-114.

- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles. *Dans Endocytobiology. Éditeurs: P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A. M. Grenier, L. Margulis et D. C. Smith. INRA Press, Paris. pp. 153-157.*
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J. et Asselin, A. 1992. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza 1: 133-136.*
- Feldmann, F., Junquiera, N. T. V. et Lieberei, R. 1989. Utilization of VA-mycorrhiza as a factor in integrated plant protection. *Agric. Ecosyst. Environ. 29: 131-135.*
- Fox, J. A. et Spasoff, L. 1972. Interaction of *Heterodera solanacearum* and *Endogone gigantea* on tobacco. *J. Nematol. 4: 224-225.*
- Francl, L. J. et Dropkin, V. H. 1985. *Glomus fasciculatum*, a weak pathogen of *Heterodera glycines*. *J. Nematol. 17: 470-475.*
- Garcia-Garrido, J. M. et Ocampo, J. A. 1987. Interaction entre micorrhizas va y organismos patogenos de plantas. *An. Edafol. Agrobiol. 46: 1233-1245.*
- Garcia-Garrido, J. M. et Ocampo, J. A. 1988. Interaccion entre *G. mosseae* y *Pseudomonas syringae* en la rizosfera de plantas de tomate. *An. Edafol. Agrobiol. 47: 1679-1686.*
- Garcia-Garrido, J. M. et Ocampo, J. A. 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol. 110: 551-555.*
- Garcia-Garrido, J. M. et Ocampo, J. A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol. Biochem. 21: 165-167.*
- Gerdemann, J. W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae *Dans The development and function of roots. Éditeurs: J. G. Torrey et D. T. Clarkson. Academic Press, New York. pp. 575-591.*



- Gianinazzi-Pearson, V., Tahirialaoui, A., Antoniw, J. F., Gianinazzi, S. et Dumas, E. 1992. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocytobiosis Cell Res.* 8: 177-185.
- Giovannetti, M., Tosi, L., Delatorre, G. et Zizzerini, A. 1991. Histological, physiological and biochemical interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Thielaviopsis basicola* in tobacco plants. *Phytopathol. Z.* 131: 265-274.
- Gonçalves, E. J., Muchovej, J. J. et Muchovej, R. M. C. 1991. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA-mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. I. Fungal and plants parameters. *Plant Soil* 132: 41-46.
- Gonçalves, E. J., Muchovej, J. J. et Muchovej, R. M. C. 1991. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA-mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. 2. Temporal-spatial relationships. *Plant Soil* 132: 47-51.
- Graham, J. H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *Hortscience* 21: 1302-1306.
- Graham, J. H. 1988. Interaction of mycorrhizal fungi with soilborne plant pathogens and other organisms: An introduction. *Phytopathology* 78: 365-366.
- Graham, J. H. et Egel, D. S. 1988. Phytophthora root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Dis.* 72: 611-614.
- Graham, J. H. et Menge, J. A. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology* 72: 95-98.
- Grandmaison, J., Olah, G. M., Van Calsteren, M.-R. et Furlan, V. 1993. Characterisation and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164.

- Halos, P. M. et Zorilla, R. A. 1979. Vesicular-arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *Pseudomonas solanacearum*. Philipp. Agr. 62: 309-315.
- Harrison, M. J. et Dixon, R. A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. Mol. Plant Microbe Interaction 6: 643-654.
- Hussey, R. S. et Roncadori, R. W. 1977. Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and an endomycorrhizal fungus on cotton. J. Nematol. 9: 270-271.
- Hussey, R. S. et Roncadori, R. W. 1978. Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Gigaspora margarita* on cotton. J. Nematol. 10: 16-20.
- Hussey, R. S. et Roncadori, R. W. 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. Plant Dis. 66: 9-14.
- Hwang, S. F., Chakravarty, P. et Prévost, D. 1993. Effects of rhizobia, metalaxyl, and VA mycorrhizal fungi on growth, nitrogen fixation, and development of *Pythium* root rot of sainfoin. Plant Dis. 77: 1093-1098.
- Hwang, S. F., Chang, K. F. et Chakravarty, P. 1992. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of *Verticillium* and *Fusarium* wilts of alfalfa. Plant Dis 76: 239-243.
- Idczak, E., Feldmann, F. et Lieberei, R. 1991. Specific response of two Poinsettia varieties to *Pythium ultimum* and VAM. Dans Mycorrhizas in Ecosystems - Structure and Function. Proceedings of the 3rd European Symposium on Mycorrhiza., Sheffield, 19-23 août 1991.
- Iqbal, S. H. et Mahmood, T. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in *Brassica napus*. Biologia (Lahore) 32: 193-200.

- Iqbal, S. H., Nasim, G. et Niaz, M. 1987. VA mycorrhiza as a deterrent to mixed pathogenic infections by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium moniliforme* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 33: 201-208.
- Iqbal, S. H., Nasim, G. et Niaz, M. 1987. I. Role of VA mycorrhiza as a deterrent against pathogenic infections caused by *Fusarium moniliforme* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 33: 271-278.
- Iqbal, S. H., Nasim, G. et Niaz, M. 1988. II. Role of vesicular-arbuscular mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 34: 79-84.
- Iqbal, S. H., Nasim, G. et Niaz, M. 1988. IV. VA mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* at different temperatures regimes. *Biologia (Lahore)* 34: 215-222.
- Jabaji-Hare, S. H. et Stobbs, L. W. 1984. Electron microscopic examination of tomato roots infected with *Glomus* sp. and tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 74: 277-279.
- Jain, R. K. et Sethi, C. L. 1987. Pathogenicity of *Heterodera cajani* on cowpea as influenced by the presence of VAM fungi, *Glomus fasciculatum* or *G. epigaeus*. *Indian J. Nematol.* 17: 165-170.
- Jalali, B. L. et Hisar, H. A. U. 1991. Mycorrhizal systems in management of plant diseases. *Mycorrhiza news (Asia)* 3: 3.
- Jones, K. et Hendrix, J. W. 1987. Inhibition of root extension in tobacco by the mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and its prevention by benomyl. *Soil Biol. Biochem.* 19: 297-299.
- Kaye, J. W., Pflieger, F. L. et Stewart, E. L. 1984. Interaction of *Glomus fasciculatum* and *Pythium ultimum* on greenhouse-grown poinsettia. *Can. J. Bot.* 62: 1575-1579.
- Kellam, M. K. et Schenck, N. C. 1980. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean. *Phytopathology* 70: 293-296.

- Khadge, B. R., Ilag, L. L. et Mew, T. W. 1990. Interaction study of *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. Dans Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février 1990. Éditeurs: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 94-95.
- Krishna, K. R. et Bagyaraj, D. J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. Can. J. Bot. 61: 2349-2351.
- Lambais, M. R. et Mehdy, M. C. 1993. Suppression of endochitinase, beta-1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. Mol. Plant Microbe Interaction 6: 75-83.
- Lieberei, R. et Feldmann, F. 1989. Physiological changes in roots colonized by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi - reactions in mutualistic and parasitic interactions. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 251-255.
- Linderman, R. G. et Paulitz, T. C. 1990. Mycorrhizal-rhizobacterial interactions. Dans Biological control of soil-born Plant Pathogens. Éditeurs: D. Hornby, R. J. Cook, Y. Henis, W. H. Ko, A. D. Rovira, B. Schippers, P. R. Scott. CAB International, Wallingford, UK. pp. 261-283.
- Mahmood, T. et Iqbal, S. H. 1982. Influence of soil moisture contents on VA mycorrhizal and pathogenic infection by *Rhizoctonia solani* in *Brassica napus*. Pak. J. Agric. Res. 3: 45-49.
- Mahmood, T. et Khurshid, T. 1988. Comparative study of VA mycorrhizae and root infecting fungi in wheat roots. Biologia (Lahore) 34: 303-308.
- Mataré, R. et Hattingh, M. J. 1978. Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Soil 49: 433-435.
- McGraw, A. C. 1983. The influence of inoculum density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on their development and on Fusarium wilt of tomato. Thèse de PhD, Univ. of Florida.

- McGraw, A. C. et Schenck, N. C. 1981. Effects of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology* 71: 894.
- Meyer, J. et Dehne, H.-W. 1986. The influence of VA mycorrhizae on biotrophic leaf pathogens. *Dans Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, 1-5 juillet 1985. Éditeur: Institut national de la recherche agronomique, Dijon. pp. 781-786.*
- Meyer, J. R. et Linderman, R. G. 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 191-196.
- Miller, J. C., Rajapakse, S. et Garber, R. K. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in vegetables crops. *Hortscience* 21: 974-984.
- Modjo, H. S. et Hendrix, J. W. 1986. The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology* 76: 688-691.
- Modjo, H. S., Hendrix, J. W. et Nesmith, W. C. 1987. Mycorrhizal fungi in relation to control of tobacco stunt disease with soil fumigants. *Soil Biol. Biochem.* 19: 289-295.
- Morandi, D., Bailey, J. A. et Gianinazzi-Pearson, V. 1983. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 357-364.
- Nemec, S. 1979. *Fusarium oxysporum* wilt disease development in key lime infected with *Glomus etunicatus*. *Dans Proceedings of the 4th North American Conference on Mycorrhizae, Colorado Univ., Fort Collins.*
- Nemec, S. et Myhre, D. 1984. Virus-*Glomus etunicatum* interactions in citrus rootstocks. *Plant Dis.* 68: 311-314.
- O'Bannon, J. H., Inserra, R. N., Nemec, S. et Vovlas, N. 1979. The influence of *Glomus mosseae* on *Tylenchulus semipenetrans* infected and uninfected *Citrus limon* seedlings. *J. Nematol.* 11: 217-250.

- O'Bannon, J. H. et Nemecek, S. 1979. The response of *Citrus limon* seedlings to a symbiont, *Glomus etunicatus*, and a pathogen, *Radopholus similis*. *J. Nematol.* 11: 270-275.
- Orolfo, E. B. 1990. Effect of the biological interactions between mycorrhiza and nematophagous fungi for the control of plant parasitic nematodes. *Dans Innovation and integration. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae, 5-8 septembre 1990, Jackson, Wyoming.* pp. 229.
- Perrin, R. 1985. L'aptitude des mycorrhizes à protéger les plantes contre les maladies: Panacée ou chimère? *Ann. Sci. For.* 42: 97-114.
- Perrin, R. 1990. Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soil-borne fungi. *Soil Use Manage.* 6: 189-195.
- Perrin, R. 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire. *Dans Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Éditeur: D. G. Strullu. Technique et documentation-Lavoisier, Paris.* pp. 93-130.
- Pinochet, J., Camprubi, A. et Calvet, C. 1993. Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of EMLA-26 apple rootstock. *Mycorrhiza* 4: 79-83.
- Priestel, G. 1980. Wechselbeziehung zwischen der endotrophen Mycorrhiza und dem Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 an Gurke. Thèse de PhD, Univ. Hannover.
- Ramaraj, B., Shanmugam, N. et Dwarakanath Reddy, A. 1988. Biocontrol of Macrophomina root rot of cowpea and Fusarium wilt of tomato by using VAM fungi. *Dans Proceedings of the 1st Asiatic Conference on Mycorrhizae, 29-31 janvier 1988. Éditeurs: A. Mahadevan, N. Raman et K. Natarajan. Madras, India.* pp. 250-251.
- Ramirez, B. N. 1974. Influence of endomycorrhizae on the relationship of inoculum density of *Phytophthora palmivora* in soil to infection of papaya roots. Thèse de M.Sc., Univ. Florida.

- Rempel, C. B. 1989. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) and fungal pathogens in wheat. Thèse de M.Sc., Univ. of Manitoba.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H. et Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11841-11843.
- Roncadori, R. W. et Hussey, R. S. 1977. Interaction of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* and root-knot nematode on cotton. Phytopathology 67: 1507-1511.
- Rosendahl, S. 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. Phytopath. Z. 114: 31-40.
- Ross, J. P. 1972. Influence of Endogone mycorrhiza on Phytophthora rot of soybean. Phytopathology 62: 896-897.
- Safir, G. 1968. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the resistance of onion to *Pyrenochaeta terrestris*. Thèse de M.Sc., Univ. Illinois.
- Salem, F. M., Salem, M. A., Fawaz, K. et Michail, S. H. 1984. Studies on the interaction between certain mycorrhizal fungi and *Meloidogyne javanica* (Treub) (Nematoda) on root-knot severity and growth on broad bean-plants. Anz. Schaedlingsk. D. Pflanzenschutz. Umweltschutz. 57: 72-74.
- Schenck, N. C., Kinloch, R. A. et Dickson, D. W. 1975. Interaction of endomycorrhizal fungi and root-knot nematode on soybean. Dans Endomycorrhizas. Éditeurs: F. E. Sanders, B. Mosse et P. B. Tinker. Academic Press, London. pp. 607-617.
- Schenck, N. C. et Kinlock, R. A. 1974. Pathogenic fungi, parasitic nematodes, and endomycorrhizal fungi associated with soybean roots in Florida. Plant Dis. Rep. 58: 169-173.
- Schenck, N. C., Ridings, W. H. et Cornell, J. A. 1977. Interaction of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Phytophthora parasitica* on two citrus root stocks. Dans Proceedings of the 3rd North American Conference on Mycorrhizae, Corvallis, OR. p. 9.

- Schönbeck, F. 1979. Endomycorrhiza in relation to plant diseases. *Dans* Soil-Borne Plant Pathogens. *Éditeurs*: B. Schippers et W. Gams. Academic Press, London, New-York, San Francisco. pp. 271-280.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1977. Damage to mycorrhizal and non mycorrhizal cotton seedlings by *Thielaviopsis basicola*. Plant Dis. Rep. 61: 266-267.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1979. Untersuchungen zum einfluß der endotrophen mykorrhiza auf pflanzenkrankheiten. 4. Pilzliche sproßparasiten, *Olpidium brassicae*, TMV. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 86: 103-112.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1981. Mycorrhiza and plant health. Gesunde Pflanzen 33: 186-190.
- Schönbeck, F. et Schinzer, U. 1972. Untersuchungen über den einfluß der endotrophen mycorrhiza auf die TMV-läsionenbildung in *Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi-nc. Phytopathol. Z. 73: 78-80.
- Schönbeck, F. et Spengler, G. 1979. Nachweis van TMV in mycorrhiza-haltigen Zellen der tomate mit hilfe der immunofluoreszenz. Phytopathol. Z. 94: 84-86.
- Schwab, S. M., Menge, J. A. et Leonard, R. T. 1983. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudangrass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiol 73: 761-765.
- Secilia, J. et Bagyaraj, D. J. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. Can. J. Microbiol. 33: 1069-1073.
- Sikora, R. A. 1979. Predisposition to *Meloidogyne* infection by the endotrophic mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Dans* Root-knot Nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and Control. *Éditeurs*: F. Lamberti et C. E. Taylor. Academic Press, New York. pp. 399-404.
- Sikora, R. A. et Schönbeck, F. 1975. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza (*Endogone mosseae*) on the population dynamics of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. hapla*. *Dans* Proceedings of the VIII International Congress of Plant protection, Moscow. pp. 158-166.



- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C. et Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Singh, Y. P., Singh, R. S. et Sitaramaiah, K. 1990. Mechanism of resistance of mycorrhizal tomato against root-knot nematode *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février. *Éditeurs*: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 96-97.
- Sivaprasad, P., Jacob, A., Nair, S. K. et George, B. 1990. Influence of VA mycorrhizal colonisation of root-knot nematode infestation in *Piper nigrum* L. *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février. *Éditeurs*: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 100-101.
- Smith, G. S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374.
- Smith, G. S., Hussey, R. S. et Roncadori, R. W. 1986. Penetration and postinfection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradices* and phosphorus. *J. Nematol.* 18: 429-435.
- Spanu, P. et Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxydase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119-124.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J. A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 187-194.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J. A. 1995. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* 5: 431-438.

- Stewart, E. L. et Pflieger, F. L. 1977. Development of poinsettia as influenced by endomycorrhizae, fertilizer and root rot pathogens *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*. *Florist's Review* 159: 37-79.
- Subhashini, D. V. 1990. The role of VA mycorrhiza in controlling certain root diseases of tobacco. *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, 14-16 février 1990. *Éditeurs*: B. L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. p. 102.
- Sundaresan, P., Raja, N. U. et Gunasekaran, P. 1993. Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with a mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to fusarium wilt disease. *J. Biosci. (Bangalore)* 18: 291-301.
- Sutton, J. C. et Sheppard, B. R. 1976. Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 54: 326-333.
- Thomas, R. S., Franson, R. L. et Bethlenfalvay, G. J. 1993. Separation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root effects on soil aggregation. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 57: 77-81.
- Thompson, J. P. et Wildermuth, G. B. 1989. Colonization of crop and pasture species with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a negative correlation with root infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Can. J. Bot.* 69: 687-693.
- Thomson, C., Hussey, R. et Roncadori, R. 1983. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus with *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* 15: 410-417.
- Tosi, L., Giovannetti, M., Zizzerini, A. et Della Torre, G. 1988. Influence of mycorrhizal tobacco roots, incorporated into the soil, on the development of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 122: 186-189.

- Traquair, J. A. et Pohlman, D. L. 1990. Endomycorrhizal biocontrol of *Cylindrocarpum* root rot of peach trees in field soil. *Dans Innovation and integration. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae*, 5-8 septembre 1990, Jackson, Wyoming. p. 288.
- Umesh, K. C., Krishnappa, K. et Bagyaraj, D. J. 1988. Interaction of burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne 1949, and VA mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* (Thaxt). Gerd and Trappe in banana (*Musa acuminata* Colla.). *Indian J. Nematol.* 18: 6-11.
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y. et Kapulnik, Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Wacker, T. L., Safir, G. R. et Stephens, C. T. 1990. Effect of *Glomus fasciculatum* on the growth of asparagus and the incidence of *Fusarium* root rot. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115: 550-554.
- Whatley, T. L. et Gerdemann, J. W. 1981. The effect of *Glomus etunicatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of soybean. *Phytopathology* 71: 912.
- Wyss, P., Boller, T. et Wiemken, A. 1989. Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 451-456.
- Wyss, P., Boller, T. et Wiemken, A. 1992. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Plant Soil* 147: 159-162.
- Zambolim, L. et Schenck, N. C. 1981. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhiza and root-rot infecting fungi on soybean. *Phytopathology* 71: 267.
- Zambolim, L. et Schenck, N. C. 1983. Reduction of the effects of pathogenic root-infecting fungi on soybean by mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Phytopathology* 73: 1402-1405.

### *Chapitre 3*

## ***Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*<sup>2</sup>***

Dans ce chapitre, nous étudions le rôle du phosphore et de l'importance de la colonisation racinaire par le champignon EVA dans l'inhibition du champignon parasite *Pythium ultimum* chez l'œillet d'Inde.

---

2 Ces résultats ont fait l'objet d'une communication à un congrès international et ont été publiés sous forme d'article:

St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, F., and Fortin, J.A. 1993a. Interaction between an arbuscular mycorrhizal fungus and *Pythium* in pot grown *Tagetes patula*. Dans Proceedings of the 6th International Congress of Plant Pathology, Montréal, 28 juillet au 6 août 1993. p. 299.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., and Fortin, J.A. 1994b. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. Can. J. Plant Pathol. 16: 187-194.

## Résumé

L'interaction entre le champignon mycorhizien à vésicules et arbuscules (VAM) *Glomus intraradices* et le *Pythium ultimum* (*Pu*) a été étudiée sur des *Tagetes patula*, en relation avec la fertilisation phosphorée (P) et avec le délai entre l'inoculation du VAM et du *Pu*. Deux *T. patula* ont été semées dans chaque pot avec un décalage de 31 jours. Le champignon VAM a été inoculé au premier semis et le *Pu* a été ajouté 5 jours après le second semis. Le champignon VAM et le *Pu* n'ont pas affecté significativement la biomasse produite. Les vésicules et les arbuscules du champignon VAM ont été retrouvées dans 1 à 46 % des racines du niveau de P le plus élevé au plus bas. Le *Pu* n'a pas affecté la colonisation des racines par le champignon VAM. La proportion des racines contenant des renflements d'hyphes du *P. ultimum* est indépendante de la nutrition en P mais réduite par le champignon VAM. La portion des racines contenant des structures fongiques est doublée suite à l'inoculation du *Pu* seul, mais n'est pas affectée par le *Pu* dans les racines mycorhizées, ce qui suggère que l'infection par le *Pu* est réduite dans ces racines. Le nombre de propagules du *Pu* dans le sol est de 10 fois inférieur dans les pots colonisés par le champignon VAM et n'est pas affecté par le niveau de P. En conséquence, l'inhibition du *Pu* observée n'est pas liée à l'amélioration de l'assimilation en P des plantes mycorhizées. Comme la présence du *Pu* est réduite dans les racines des plus jeunes plantes, lesquelles n'étaient pas initialement mycorhizées mais semées dans un sol colonisé par le champignon VAM, la réduction de la présence du *Pu* par le champignon VAM peut être attribuable soit à une rapide stimulation des mécanismes de résistance de la plante au contact du champignon VAM ou à une interaction entre les deux champignons dans le sol.

**Mots-clés:** mycorhize à vésicules et arbuscules, parasite, maladie, tagète, lutte biologique

## Summary

Interactions between the vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus intraradices* and *Pythium ultimum* (*Pu*) were studied on *Tagetes patula* in relation to P fertilization and delay between the VAM and pathogen inoculation. Two *T. patula* seed were sown in each pot 31 days apart. The VAM fungus was inoculated at first sowing and *Pu* was added 5 days after the second sowing. VAM fungus and *Pu* did not affect plant biomass. Vesicles and arbuscules of the VAM fungus were found in 1 to 46 % of root length from the highest to the lowest P level. *Pu* did not affect VAM colonization. Root length bearing hyphal swellings of *Pu* was unrelated to P nutrition, but was reduced by VAM colonization. Root length bearing fungal structures was doubled by inoculation with *Pu* alone, but unaffected by *Pu* inoculation in VAM roots, suggesting that pathogen infection was lower in VAM roots. Number of *Pu* propagules in growth substrate was 10 times lower in VAM systems than in controls and was not affected by P level. Therefore, the observed inhibition of *Pu* was not related to improved P nutrition of VAM plants. As root colonization by *Pu* was reduced in the young plants that were not initially mycorrhizal but sown in VAM colonized soil, the reduction of *Pu* by the VAM fungus could be attributable either to a rapid stimulation of disease resistance mechanisms when the plants were contacted by the VAM fungus, to interaction between the two fungi in soil or due to induced antagonism.

**Keywords:** vesicular-arbuscular mycorrhizae, pathogen, disease, marigold, biological control

## Introduction

An intimate relationship between vascular plants and vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi has developed in the course of 400 million years of coevolution (Simon et al. 1993). The vesicular arbuscular endophytes are ecologically important for most vascular plants because of their beneficial effects on plant growth and survival. Among other benefits, the VAM fungi can reduce plant diseases (Caron 1989a; Dehne 1982; Graham 1986; Perrin 1990; Schönbeck 1979). However, the mechanisms involved in VA mycorrhizae mediated resistance against pathogens are not well understood.

This effect of VAM fungi has been attributed to several different causes. Much emphasis has been placed on the improved nutrition of mycorrhizal plants to explain their resistance to disease development (Smith 1988). Increased phosphorus (P) assimilation has been proposed to explain both a higher susceptibility of mycorrhizal cotton plants to verticillium wilt (Davis et al. 1979), and a higher resistance of citrus to phytophthora root rot (Davis and Menge 1980) and of wheat to take-all (Graham and Menge 1982). However, other authors observed no effects of P fertilization on disease symptoms or on the pathogen population (Caron et al. 1986c), or obtained results that could not be explained by P assimilation alone (Garcia-Garrido and Ocampo 1988b; Giovannetti et al. 1991; Rosendahl 1985; Rosendahl and Rosendahl 1990).

Stimulation of host plant disease resistance by mycorrhizal fungi has also been postulated (Caron et al. 1986d; Rosendahl 1985). Responses associated with resistance mechanisms have been studied in mycorrhizal plants, but contradictory reports exist on their possible role in disease suppression. Stimulation of physical and chemical barriers in response to mycorrhization has been reported (Baltruschat and Schönbeck 1975; Dehne and Schönbeck 1979b; Dehne et al. 1978; Grandmaison et al. 1993; Krishna and Bagyaraj 1983; Lieberei and Feldmann 1989; Morandi et al. 1984), as well as the absence of stimulation of such defence mechanisms (Codignola et al. 1989; Dumas et al. 1989; Dumas et al. 1990; Gianinazzi-Pearson et al. 1992; Spanu and Bonfante-Fasolo 1988; Wyss et al. 1989).

To our knowledge, the work of Caron et al. (1986c) is the only one clearly showing that P fertilization alone cannot explain the observed reduction in disease severity and *Fusarium oxysporum* population. It suggests the involvement of mechanisms other than increased P assimilation in increased disease resistance in mycorrhizal tomato plants. The purpose of this paper was therefore (1) to examine this suggestion by observing the interaction of *Tagetes patula* L., *Pythium ultimum* Trow, and *Glomus intraradices* Schenck & Smith in relation with P fertilization, and (2) to study the effect of two different time periods between the VAM and pathogen inoculation.



## Materials and methods

### EXPERIMENTAL DESIGN

Plants of *Tagetes patula* L. were grown from seeds in pots colonized ( $G+$ ) or not ( $G-$ ) with *G. intraradices*. The mycorrhizal fungus was allowed to become well established in the soil of the designated pots for 31 days, before other seeds of *T. patula* were sown beside the first plant. Five days later, the plants were inoculated either with *P. ultimum* ( $Pu+$ ) or with sterile water ( $Pu-$ ). The inoculation treatments were: *G. intraradices* only ( $G+Pu-$ ), *P. ultimum* only ( $G-Pu+$ ), *G. intraradices* and *P. ultimum* ( $G+Pu+$ ), and control ( $G-Pu-$ ). The interaction between the plants, the pathogen, and the mycorrhizal fungus was studied under three P fertilization levels as described below.

The experimental design was a split plot in four blocks, with the three P fertilizations randomized among the main plots and the four inoculation treatments randomized among the subplots.

### MYCORRHIZAL INOCULUM

The inoculum consisted of fresh roots of pot-grown *Zea mays* L. colonized at 70 % by *G. intraradices*. The initial inoculum used to produce the mycorrhizal *Z. mays* consisted of roots of leek (*Allium porrum* L.) colonized by *G. intraradices* (DAOM 181 602). The roots were cut into 1 cm segments and mixed thoroughly. One gram of roots was used to inoculate each pot. Controls received autoclaved (20 min, 121 °C) VAM *Z. mays* roots which had been previously soaked for 30 min in 200 mL sterile distilled water. After filtration on 2.7  $\mu$ m glass microfiber filter (Whatman GF/D), 3 mL of the VAM root washings were spread on the autoclaved *Z. mays* roots in an attempt to introduce the microflora usually associated with mycorrhizal roots, but without *G. intraradices*.

### PATHOGEN INOCULUM

Petri dishes received 10 mL of molten oatmeal agar supplemented with 1.5 % cholesterol and were placed so that the medium solidified as a slant on one side of the

dishes. Twenty millilitres of sterile, distilled water was then added to the dishes and the medium was inoculated with a plug from the margin of a 24-h-old colony of *P. ultimum* N1 growing on potato dextrose agar. After 20 days of growth at 24°C, the mycelium and sporangia were collected from the water surface in 10 petri dishes and homogenized for 20 sec with a Waring blender in sterile distilled water. The final concentration was 230 000 colony forming units (CFU).mL<sup>-1</sup>, as determined by dilution and plating on potato dextrose agar.

#### PRODUCTION OF PLANTS AND INOCULATION

Seeds of *Tagetes patula* cv. Aurora (61-4333, W.H. Perron Compagnie Ltée, 2914 boul. Labelle, Laval, Québec, Canada H7P 5R9) were surface sterilized 5 min in 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rinsed with sterile, distilled water. Three seeds were sown per 12 cm plastic pot which contained 600 cc of autoclaved (2 h, 121°C) and sieved (2 mm) substrate composed of a 1:1 mix of perlite and vermiculite. The live or control *G. intraradices* inoculum was uniformly spread 2 cm under the substrate surface at sowing time, in designated pots. Thirty-one days were allowed for the establishment of the mycorrhizal root systems in soil. Then another group of 3 seeds of *T. patula* was sown in each pot beside the established plant. For each sowing date, the plantlets were thinned out 10 days after emergence to keep one plant of each group per pot. A 1-cm thick layer of silica sand was added to the surface of each pot to minimize cross contamination between pots.

Five days after the second seeding, the substrate at the base of the two plantlets in each of the designated pots received either 2 mL of the *P. ultimum* inoculum or 2 mL of sterile distilled water. Two plants per pot were used because: 1) the second plant which was 5 days-old at *P. ultimum* inoculation is far more susceptible to infection than the first one (36 days-old); 2) the second plant is at the very beginning of VAM colonization at the time of *P. ultimum* inoculation while the first one is already well colonized.

## GROWTH CONDITIONS

In order to minimize airborne contaminations, the plants were placed in an enclosed muslin isolation area inside a greenhouse (1.8 × 1.5 m). Natural light was supplemented inside the growth area with 24 Vita-Lite® 40 W fluorescent tubes which were placed at a height of 1.5 m and operated 14 h a day. This provided a minimum photon flux of 125 microEinsteins·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). The maximum and minimum temperatures were 26°C (day) and 17°C (night). The initial soluble P content of the substrate was 0.6 µg·g<sup>-1</sup> (SSE; Lucas et al. 1972) and the available P was 2.45 µg·g<sup>-1</sup> (Bray 1; Bray and Kurtz 1945). Each pot received 25 mL·wk<sup>-1</sup> of a modified Long Ashton nutrient solution (Hewitt 1966). Concentrations of 44.8, 1000, or 2000 µg P·mL<sup>-1</sup> were obtained by modifying NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in the nutrient solution in order to give 1.12, 25 or 50 mg P·wk<sup>-1</sup>·pot<sup>-1</sup>. Plants were watered as needed with distilled water and, for the first two weeks after inoculation with the pathogen, the substrate was kept wet by leaving water permanently in the saucer under each pot. Before and after these two weeks, overwatering was avoided, but if there was excess water, it was kept in the saucer to be reabsorbed by the plants. Two months after sowing the first group of seeds, Captan 50 WP was used to control a beginning *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. infection on the flowers; the substrate was protected from the fungicide spray by a layer of hydrophobic cotton.

## PARAMETERS MEASURED

The plants were harvested 60 days after inoculation with *P. ultimum*. Root necrosis was estimated on a scale where 1 = <1 %, 2 = 1–3 %, 3 = 4–5 %, 4 = 6–10 %, and 5 = >10 % of roots necrotic. The severity of collar necrosis was determined from a scale in which 1 = 0–1, 2 = 2–3, 3 = 4–5, 4 = 6–10 necrotic spots, and 5 = 1/3 or more of the surface necrotic. Roots were cut in 1-cm sections, thoroughly mixed, and after staining of a subsample with acid fuchsin (Kormanik and McGraw 1982), the percentage of root length colonized by *G. intraradices* and *P. ultimum* was determined using the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980). The following structure classes were used in counts: hyphae alone, *P. ultimum* hyphal swellings, *G. intraradices* vesicles and arbuscules, or no fungal structures present. The *P. ultimum* population density was

estimated on P<sub>5</sub>ARP medium (Jeffers and Martin 1986) using a dilution technique (Dhingra and Sinclair 1985). The substrate from each pot was mixed and samples were taken for pathogen population enumeration. For blocks 1 and 2, 5-g samples of substrate were shaken for 1 h in 45 mL of 0.12 % water agar and a 1-mL aliquot was spread on two dishes of selective medium for each of four successive 1:10 dilutions. For blocks 3 and 4, 15-g samples of substrate were used as described and two more dishes were inoculated with 1-g samples of undiluted substrate; water content of substrate for each pot was determined after drying a 5-g sample at 100°C for 24 h. Total dry mass (shoots and roots) of each plant was determined after drying at 70°C for 24 h.

#### STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analyses were done with General Linear Model procedures of SAS software (SAS Institute Inc. 1987) and Log Linear Analysis of STATGRAPHICS software (STSC Inc. 1988). Effects of P concentrations and inoculation treatments on plant biomass were analysed by ANOVA, and *a posteriori* comparisons between treatments were done by Bonferoni tests. Root and collar necrosis classes were compared with frequency tables analysis using a log linear model. In *P. ultimum*-inoculated pots, CFU were compared by ANOVA. Percentages of colonized root length were compared by ANOVA for P effect and inoculation treatment effect, and *a posteriori* comparisons between treatments were done by Duncan's multiple range test. The effect of the delay between inoculation with *G. intraradices* and with *P. ultimum* was analysed by MANOVA. Arcsine transformation (Draper and Smith 1981) was used for all percentage data, except for the percentage of hyphae in roots of the youngest plants, in order to meet the requirements of the tests.

## Results

The  $G^-$  and  $Pu^-$  control plants were free of mycorrhizae and of *P. ultimum* propagules, respectively. Thus, data from  $G^-$  controls ( $G^-Pu^-$ ,  $G^-Pu^+$ ) were not included in the percentages of root length bearing *G. intraradices* arbuscules or vesicles analysis of variance; nor were data from  $Pu^-$  controls ( $G^-Pu^-$ ,  $G^+Pu^-$ ) included in the percentages of root length bearing *P. ultimum* hyphal swellings and number of CFU analysis of variance.

The number of propagules of *P. ultimum* was ten times lower in the substrate of *G. intraradices*-inoculated plants than in controls (Table IX). There was no correlation between P concentration in the nutrient solution and the population of *P. ultimum* in the substrate, and no interaction between VAM inoculation and P.

In *G. intraradices*-inoculated plants, root length bearing vesicles or arbuscules of the mycorrhizal fungus was inversely related to P concentration, ranging from 46 % at the lowest P to 1 % at the highest level, but was unaffected by *P. ultimum* inoculation treatment (Table X-A). The mean percentage of root segments bearing *P. ultimum* hyphal swellings decreased from 4.8 % to 2.7 % in oldest plants and from 4.3 % to 1.9 % in youngest plant roots due to VAM colonization, although the difference was significant only in the youngest plants; P concentration had no significant effect on this variable (Table X-B). In the youngest and oldest plants, the percentage of root length bearing fungal structures was significantly increased by *G. intraradices* inoculation, but was not significantly affected by *P. ultimum* inoculation and by P concentration (Table XI). There was no  $P*G$  and  $P*Pu$  interactions. In non-mycorrhizal plants, *P. ultimum* approximately doubled the root length bearing fungal structures (Table XI and Figure 2), while in mycorrhizal plants, the pathogen did not substantially increase the colonized root length leading to a significant  $G*Pu$  interaction ( $P<0.001$ ) in the oldest plants but not in the youngest plants ( $P<0.10$ ). In the oldest and youngest plants considered together (MANOVA), both *G. intraradices* and *P. ultimum* significantly increased the root colonization ( $P<0.05$ ) which was unaffected by P concentration. The MANOVA  $G*Pu$

interaction was significant ( $P < 0.05$ ) while the  $P * G$  and  $P * Pu$  interactions were not significant (respectively  $P = 0.19$  and  $0.61$ ).

There was no effect of *G. intraradices* or *P. ultimum* on *T. patula* dry mass, while P concentrations significantly modified the biomass of the plants (Table XII). In the oldest plants, dry mass from the medium P concentration was significantly higher than dry mass from the lowest P concentration. In the youngest plants, because of a significant  $P * G * Pu$  interaction, the effect of P on dry mass was analysed separately for each inoculation treatment ( $G^-Pu^-$ ,  $G^-Pu^+$ ,  $G^+Pu^-$  and  $G^+Pu^+$ ). For the  $G^-Pu^+$  and  $G^+Pu^-$  treatments, dry mass from the lowest P concentration was significantly higher than dry mass from the two higher concentrations. The same tendency was obtained for the  $G^-Pu^-$  treatment, but the difference was not significant. For the  $G^+Pu^+$  treatment, dry mass from the medium P level was significantly higher than dry mass from the highest P level, while dry mass from the lowest P level did not differ from dry mass of the other levels.

There was no effect of inoculation with *G. intraradices* or with *P. ultimum* on root and collar necrosis. Independently of the presence of *P. ultimum* and of *G. intraradices*, P concentrations significantly modified the incidence of necrosis (Table XIII). Oldest plants had significantly less collar necrosis at the medium P concentration and more root necrosis at the highest P level. In the youngest plants, the medium P concentration gave significantly less root necrosis and the highest P level promoted more collar and root necrosis.

**Table IX.** Effects of *Glomus intraradices* (*G*) and P concentrations in the nutrient solution on the number of propagules of *Pythium ultimum* in the growth substrate of *Tagetes patula*.

P concentration (mg·wk <sup>-1</sup> )	<i>P. ultimum</i> propagules (CFU·g <sup>-1</sup> )*		
	<i>G</i> <sup>-</sup>	<i>G</i> <sup>+</sup>	Mean†
1.12	111.0	13.5	62.3a
25.00	268.5	26.5	147.5a
50.00	149.3	12.5	80.9a
Mean†	176.3a	17.5b	

\*Values are means of two estimates by pot and of four pots by inoculation treatment.

†Means with the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) by the Duncan multiple range test.

**Table X.** Effects of P concentrations in nutrient solution, and inoculation with *Glomus intraradices* (*G*) or inoculation with *Pythium ultimum* (*Pu*) on the percentage of root length of *Tagetes patula* bearing: (A) *Glomus intraradices* vesicles or arbuscules, (B) *Pythium ultimum* hyphal swellings.

Phosphorus (mg·wk <sup>-1</sup> )	A. <i>Glomus intraradices</i> vesicles or arbuscules (%)					
	Oldest plant			Youngest plant		
	<i>Pu</i> <sup>-</sup>	<i>Pu</i> <sup>+</sup>	Mean	<i>Pu</i> <sup>-</sup>	<i>Pu</i> <sup>+</sup>	Mean <sup>†</sup>
1.12	43.8	48.2	46.0a	44.5	48.0	46.3a
25.00	11.2	9.2	10.2b	11.7	4.5	8.1b
50.00	1.8	1.3	1.5b	0.0	1.8	0.9b
Mean <sup>†</sup>	18.9a	19.6a		18.8a	18.1a	
	B. <i>Pythium ultimum</i> hyphal swellings (%)					
	Oldest plant			Youngest plant		
	<i>G</i> <sup>-</sup>	<i>G</i> <sup>+</sup>	Mean	<i>G</i> <sup>-</sup>	<i>G</i> <sup>+</sup>	Mean
1.12	8.5	5.3	6.9a	6.0	2.0	4.0a
25.00	4.3	1.8	3.0a	3.5	3.0	3.3a
50.00	1.7	1.0	1.4a	3.3	0.8	2.0a
Mean	4.8a	2.7a		4.3a	1.9b	

\* Percent root length colonized by *Glomus intraradices* or *Pythium ultimum* was evaluated with the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980).

† Means with the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) by the Duncan multiple range test.

† Means with the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) by the Duncan multiple range test.



**Table XI.** Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with *Glomus intraradices* (G<sup>+</sup>) and inoculation with *Pythium ultimum* (Pu) on the percentage of root length of *Tagetes patula* bearing fungal structures.

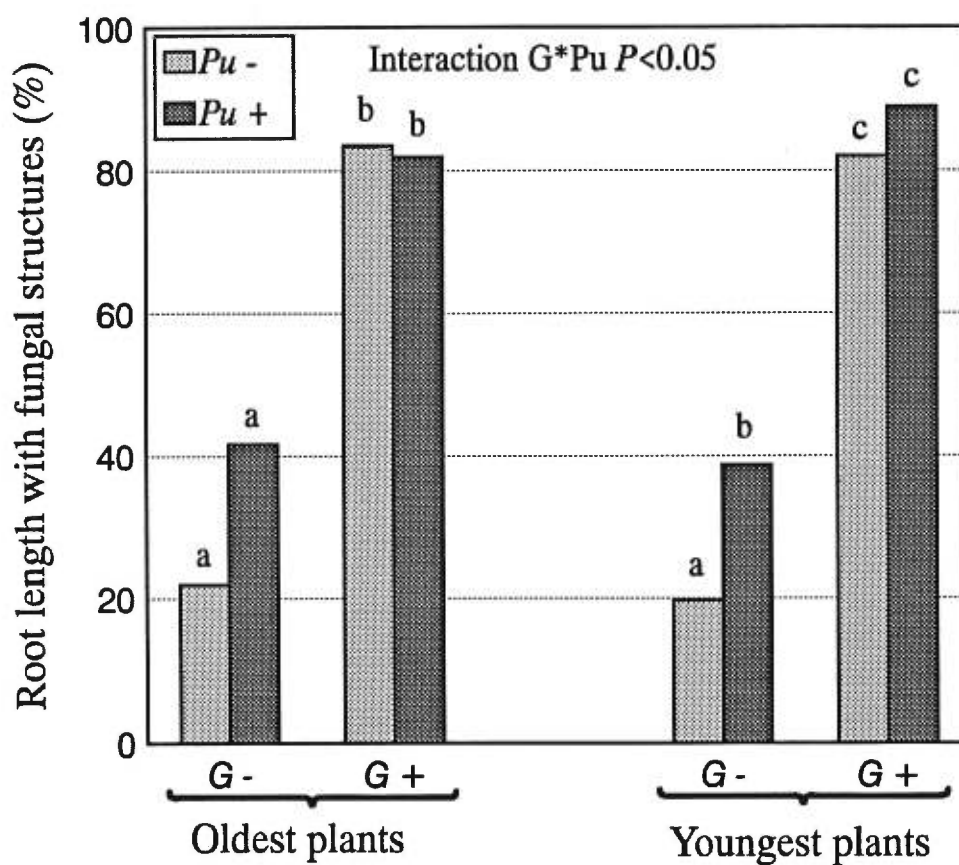
Phosphorus (mg·wk <sup>-1</sup> )	Total fungal structures (%)															
	Oldest plant						Youngest plant									
	G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G <sup>†</sup>		Mean P		G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G		Mean P <sup>†</sup>	
Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>
1.12	17.2	45.3	97.7	98.7	57.5	72.0	64.8a	16.0	38.5	98.5	99.5	57.2	69.0	63.1a		
25.00	20.2	33.3	77.5	76.8	48.9	55.0	51.9a	15.8	28.5	75.5	84.7	45.6	56.6	51.1a		
50.00	28.2	46.3	75.5	70.5	51.9	58.4	55.1a	29.9	49.2	72.2	82.5	54.1	65.9	60.4a		
Mean Pu <sup>†</sup>	21.9	41.6	83.6	82.0	52.7a	61.8a		19.7	38.7	82.1	88.9	52.2a	63.8a			
Mean G	31.8a		82.8b					29.6a		85.5b						

\*Percent root length bearing fungal structures was evaluated with the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980); fungal structures includes fungal hyphae alone, *G. intraradices* vesicles or arbuscules, and *P. ultimum* hyphal swellings.

†G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> treatments.

‡Means with the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) by the Duncan multiple range test.

**Figure 2.** Effects of inoculation with *Glomus intraradices* (*G*) and *Pythium ultimum* (*Pu*) on the percentage of *Tagetes patula* root length bearing fungal structures in a two-plant pot system. Fungal structures are hyphae alone, *G. intraradices* vesicles or arbuscules, and *P. ultimum* hyphal swellings.



**Table XII.** Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with *Glomus intraradices* (*G*) and inoculation with *Pythium ultimum* (*Pu*) on dry mass of *Tagetes patula* in a two-plant pot system.

Plant	Phosphorus (mg·wk <sup>-1</sup> )	Dry mass* (g)				Mean
		<i>G</i> <sup>-</sup>		<i>G</i> <sup>+</sup>		
		<i>Pu</i> <sup>-</sup>	<i>Pu</i> <sup>+</sup>	<i>Pu</i> <sup>-</sup>	<i>Pu</i> <sup>+</sup>	
Oldest	1.12	2.124	1.886	1.867	2.042	1.980a
	25.00	2.274	2.023	2.218	1.959	2.118b
	50.00	2.049	2.200	2.032	1.802	2.020ab
Youngest	1.12	0.227a <sup>†</sup>	0.306a	0.239a	0.191ab	0.241 <sup>†</sup>
	25.00	0.104a	0.089b	0.092b	0.246a	0.133
	50.00	0.075a	0.069b	0.069b	0.095b	0.077

\*There is no effect of inoculation treatments on dry mass of plants. Within a column, means with the same letter are not significantly different ( $P=0.05$ ) by the Bonferoni multiple range test.

<sup>†</sup>Because of a significant  $P*G*Pu$  interaction, dry mass of the youngest plants was analysed separately for each inoculation treatment.

**Table XIII.** Effects of P concentrations in nutrient solution, inoculation with *Glomus intraradices* (G) and inoculation with *Pythium ultimum* (Pu) on the root and collar necrosis of *Tagetes patula* in a two-plant pot system.

Phosphorus (mg.wk <sup>-1</sup> )	Collar necrosis <sup>†</sup>														
	Oldest plant						Youngest plant								
	G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G <sup>#</sup>		Mean P <sup>‡</sup>		G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G		Mean P
	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	
1.12	3.0	3.0	1.8	2.5	2.4	2.7	2.6	2.6	3.0	1.0	1.5	1.8	2.2	1.4	1.8
25.00	2.0	2.7	2.0	1.0	2.0	1.9	1.9*	1.9*	2.2	4.0	3.2	3.0	2.7	3.5	3.1
50.00	4.0	3.5	3.5	3.7	3.7	3.6	3.7	3.7	4.7	4.7	5.0	4.7	4.9	4.7	4.8***
Mean Pu	3.0	3.1	2.4	2.4	2.7	2.7	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
Mean G	3.0		2.4				3.2	3.2	3.2		3.2				

Phosphorus (mg.wk <sup>-1</sup> )	Root necrosis <sup>§</sup>														
	Oldest plant						Youngest plant								
	G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G		Mean P		G <sup>-</sup>		G <sup>+</sup>		all G		Mean P
	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	Pu <sup>-</sup>	Pu <sup>+</sup>	
1.12	2.5	2.0	1.5	2.2	2.0	2.1	2.1	2.1	3.0	3.5	2.0	3.5	2.5	3.5	3.0
25.00	1.3	2.7	2.0	2.2	1.6	2.5	2.1	2.1	1.5	3.0	2.2	2.5	1.9	2.7	2.3*
50.00	4.5	4.2	5.0	3.7	4.7	4.0	4.4***	4.4***	4.7	4.2	5.0	4.2	4.9	4.2	4.5**
Mean Pu	2.7	2.8	3.0	2.7	2.9	2.8	2.9	2.9	2.9	3.1	3.6	3.4	3.3	3.2	
Mean G	2.9		2.8				3.3	3.3	3.2		3.2				

<sup>†</sup>Scale of 1 to 5 where 1= 0-1, 2= 2-3, 3= 4-5, 4= 6-10 necrotic spots, and 5= 1/3 or more of the surface necrotic.

<sup>#</sup>G<sup>+</sup> and G<sup>-</sup> treatments.

<sup>‡</sup>In a column, means followed by stars are statistically different (\*, P=0.05; \*\*, P=0.01; \*\*\*, P=0.001) by a frequency tables analysis using a log linear model.

<sup>§</sup>Scale of 1 to 5 where 1= <1 %, 2= 1-3 %, 3= 4-5 %, 4= 6-10 %, and 5= >10 % of roots necrotic.

## Discussion

The use of comparable treated and untreated plants is essential to determine the effects and interactions of inoculation with mycorrhizae, inoculation with pathogen, and P fertilization (Smith 1988). In this experiment, neither *G. intraradices* nor *P. ultimum* had any effect on plant biomass and root or collar necrosis. The phosphorus concentration of the nutrient solution had a significant effect on plant biomass, but this effect was independent of the presence of the two fungi and reflected only the availability of nutrients and the competition between the oldest and youngest plant in each pot. The effect of P concentration on root and collar necrosis was also independent of the inoculation treatment and could be attributed to the accumulation of mineral salts up to a toxic level at the highest P fertilization level. Since the plants had plenty of water and nutrients, they could probably compensate for the attack of young feeder root tips by *P. ultimum*, and similarly they could not gain additional nutritive benefit of being colonized by *G. intraradices*. Thus, the experimental units were comparable within each P level in regard to the plant response to colonization by the two fungi either individually or together, or in regard to the effect of the presence of *G. intraradices* on *P. ultimum* propagule number in the substrate.

In this experiment, the number of propagules of *P. ultimum* recovered from the substrate was consistently and considerably lower in mycorrhizal systems as compared to controls, and this inhibition was not related to the P concentration of the nutrient solution. This is a clear confirmation of the results of Caron et al. (1986c), who worked with mycorrhizal tomato plants challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in a range of P concentrations. Their results clearly demonstrated that better assimilation of P did not explain the higher resistance to disease of mycorrhizal tomato plants nor the reduction of *F. oxysporum* propagules in the root environment. Giovannetti et al. (1991), working with mycorrhizal tobacco plants challenged with *Thielaviopsis basicola*, also concluded that a more specific effect than better P nutrition was suggested from their results, but were unable to directly demonstrate their conclusion. Moreover, Rosendahl (1985) obtained no difference in *Aphanomyces euteiches* oospore production in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of mycorrhizal peas in a split-root growth system, even if P was higher in the part colonized by

the VAM fungus. In addition, Garcia-Garrido & Ocampo (1988b) reported a protective effect of mycorrhization against *Erwinia carotovora* pv *carotovora* on tomato plants and on bacteria population in the rhizosphere, irrespective of the P concentration in the plants. Finally, Kaye et al. (1984) also obtained an inhibition of *P. ultimum* propagules in the rhizosphere of mycorrhizal poinsettias and concluded, because mycorrhization did not enhance P nutrition in the absence of *P. ultimum*, that the mycorrhizal plant tolerance must be attributed to factors other than improved plant nutrition alone.

It is not possible to conclude with certainty from our results whether the effect of the mycorrhizal fungus occurs inside the roots of the host plant or within the extraradical phase of the fungus in the substrate, as suggested by Caron et al. (1985; 1986c).

The effects of inoculation treatments on the percentage of root length bearing fungal structures of any kind have revealed clearly an interaction between the effects of inoculation with *G. intraradices* and of inoculation with *P. ultimum*. While inoculation of mycorrhizal systems with *P. ultimum* did not increase root colonization as compared to inoculation with *G. intraradices* alone, inoculation with *P. ultimum* alone approximately doubled the percentage of root length bearing fungal structures. Thus, there was a mutualistic negative effect of the two fungi on each other or one fungus reduced the other.

The presence of characteristic structures of each fungus could provide a better insight on this interaction. The percentage of root length bearing vesicles or arbuscules of the VAM fungus was not affected by the pathogen. In contrast, the presence of hyphal swellings of *P. ultimum* was reduced by mycorrhization although the effect was statistically significant only in the youngest plants. Even if these two kinds of structures did not exactly represent the level of colonization of the roots with the VAM fungus or with the pathogen, this does indicate an absence of a detrimental effect of the pathogen on the VAM fungus, and a detrimental effect of the latter on the former. From these results, we postulate that the interaction between *G. intraradices* and *P. ultimum* is due to a competitive superiority of the VAM fungus over the pathogen in the roots of the mycorrhizal plants. This internal reduction, however, does not rule out the possibility of a concurrent extraradical interaction between the two fungi.

The percentage of root length bearing arbuscules or vesicles of the VAM fungus was also unrelated to the observed reduction of *P. ultimum* in the roots or in the substrate. This result contradicts the statement that high levels of mycorrhization are necessary to induce a protection against a pathogen (Graham and Menge 1982; Smith 1988; Smith et al. 1986) and agrees with the results of Caron et al. (1986c), who obtained protection of tomato plants against *F. oxysporum*, even at very low colonization levels. Interestingly, the percentage of root length with vesicles or arbuscules was drastically reduced at the highest P concentration used, but the hyphal colonization in plants inoculated with *G. intraradices* was unaffected by P. Therefore, it is possible that the level of colonization with *G. intraradices* in the roots was not decreased by P, which could have reduced only the amount of vesicles and arbuscules formed. This might modify the interpretation of the importance of the level of colonization on the inhibition of the pathogen.

The oldest plants had 37 days to become heavily mycorrhizal before inoculation with the pathogen, while the youngest plants were sown only 5 days before inoculation with *P. ultimum*. Appressoria of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi form within 36 h of inoculation and the first arbuscules form within 42-48 h (Giovannetti and Citernesi 1993). The colonization of the youngest *T. patula* plants by the VAM fungus was therefore just beginning at the moment of pathogen inoculation. Consequently, it is reasonable to assume that the level of root colonization with the mycorrhizal fungus is not a factor in the inhibition of the pathogen, as stated for other mycorrhizal plant - pathogen interactions.

Our results do not suggest that P nutrition (Graham and Menge 1982) and competition for space or nutrients in the roots are involved in mycorrhizal plant protection, but rather lead to the possibility of two types of mechanisms: 1) induction of host plant resistance mechanisms by the mycorrhizal fungus or 2) direct or indirect competition effect near the roots and the extraradical phase of the VAM fungus in the substrate. The first possibility was recently supported by the results of Benhamou et al. (1994), which showed an important stimulation of resistance mechanisms in Ri T-DNA-transformed carrot roots inoculated with *G. intraradices* for only 7 days and challenged with *F. oxysporum*. Stimulation of resistance

mechanisms in mycorrhizal plants, however, is poorly known and more research in this area is needed.

The inhibition of *P. ultimum* could also be due to a difference in the microflora introduced in the VAM and nonVAM treatments rather to a direct effect of the VAM fungus on the host plant or to a direct interaction between the VAM fungus and the pathogen. We attempted to reintroduce the microflora associated with the VAM root inoculum into pots by soaking VAM roots in sterile water and using this washing after filtration, with autoclaved VAM roots, as inoculum for the controls. However, the bacteria loosely adhering to the rhizoplane and rhizosphere had more chances to be reintroduced in comparable quantities than the microflora located inside the roots, in the cortex, even if the roots were cut in small fragments before soaking. These microbes from the interior of the roots could be responsible for the suppressiveness to *P. ultimum* in the VAM treatments. It is now demonstrated that quantitative and qualitative changes occur in the rhizosphere microflora of mycorrhizal plants (Ames et al. 1984; Bagyaraj and Menge 1978; Meyer and Linderman 1986b; Secilia and Bagyaraj 1987). If that type of microbial population shift occurs also inside the roots, this could explain the results of this experiment and would support the second type of mechanism proposed.

In conclusion, inoculation with *G. intraradices* clearly reduced *P. ultimum* development in roots, as well as *P. ultimum* propagules numbers in the *T. patula* mycorrhizosphere, in ways that could not be explained simply by a better phosphorus nutrition of the mycorrhizal plants nor by the level of VAM colonization of the roots.



## Acknowledgement

We wish to thank B. Vimard for excellent technical work and S. Daigle for good advise on experimental design and statistical analysis. The leek roots colonized with *G. intraradices* (DAOM 181 602) were kindly provided by Dr. V. Furlan (Agriculture Canada, 2560 boul. Hochelaga, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 2J3). *P. ultimum* N1 was kindly provided by Dr. T.C. Paulitz (McGill University, Macdonald College, Department of Plant Sciences, St Anne de Bellevue, Québec, Canada H9X 3V9). This research was supported by an NSERC operating grant to J. André Fortin.

## Literature cited

- Ames, R.N., Reid, C.P.P., and Ingham, E.R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 96: 555-563.
- Bagyaraj, D.J., and Menge, J.A. 1978. Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora. *New Phytol.* 80: 567-573.
- Baltruschat, H., and Schönbeck, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathol. Z.* 84: 172-188.
- Benhamou, N., Fortin, J.A., Hamel, C., St-Arnaud, M., and Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84: 958-968.
- Bray, R., and Kurtz, L. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus. *Soil Sci.* 59: 39-42.
- Caron, M. 1989. Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 177-179.
- Caron, M., Fortin, J.A., and Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. *Plant Soil* 87: 233-239.
- Caron, M., Fortin, J.A., and Richard, C. 1986a. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.
- Caron, M., Richard, C., and Fortin, J.A. 1986b. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 67: 15-19.

- Codignola, A., Verotta, L., Spanu, P., Maffei, M., Scannerini, S., and Bonfante-Fasolo, P. 1989. Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 112: 221-228.
- Davis, R.M., and Menge, J.A. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on Phytophthora root rot of Citrus. *Phytopathology* 70: 447-452.
- Davis, R.M., Menge, J.A., and Erwin, D.C. 1979. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456.
- Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Dehne, H.-W., and Schönbeck, F. 1979. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten II. Phenolstoffwechsel und Lignifizierung. *Phytopathol. Z.* 95: 210-216.
- Dehne, H.-W., Schönbeck, F., and Baltruschat, H. 1978. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten 3. Chitinase-aktivität und Ornithinzyklus. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 85: 666-678.
- Dhingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1985. *Basic plant pathology methods*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Draper, N.R., and Smith, H. 1981. *Applied regression analysis*. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V., and Gianinazzi, S. 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 111-114.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles *In* *Endocytobiology*. Edited by P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Grenier, L. Margulis, and D.C. Smith. INRA Press, Paris. pp. 153-157.

- Garcia-Garrido, J.M., and Ocampo, J.A. 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol.* 110: 551-555.
- Gianinazzi-Pearson, V., Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F., Gianinazzi, S., and Dumas, E. 1992. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocytobiosis Cell Res.* 8: 177-185.
- Giovannetti, M., and Citernesi, A.S. 1993. Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 97: 1140-1142.
- Giovannetti, M., and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., Tosi, L., Delatorre, G., and Zizzerini, A. 1991. Histological, physiological and biochemical interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Thielaviopsis basicola* in tobacco plants. *Phytopathol. Z.* 131: 265-274.
- Graham, J.H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *Hortscience* 21: 1302-1306.
- Graham, J.H., and Menge, J.A. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology* 72: 95-98.
- Grandmaison, J., Olah, G.M., Van Calsteren, M.-R., and Furlan, V. 1993. Characterisation and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164.
- Hewitt, E. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. East Malling.
- Jeffers, S.N., and Martin, S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70: 1038-1043.
- Kaye, J.W., Pflieger, F.L., and Stewart, E.L. 1984. Interaction of *Glomus fasciculatum* and *Pythium ultimum* on greenhouse-grown poinsettia. *Can. J. Bot.* 62: 1575-1579.

- Kormanik, P.P., and McGraw, A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots *In* Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Edited by N.C. Schenck. APS Press, St Paul MN. pp. 37-45.
- Krishna, K.R., and Bagyaraj, D.J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. Can. J. Bot. 61: 2349-2351.
- Lieberei, R., and Feldmann, F. 1989. Physiological changes in roots colonized by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi – reactions in mutualistic and parasitic interactions. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 251-255.
- Lucas, R., Rieke, P., and Doll, E. 1972. Soil saturated extract method for determining plant-nutrient levels in peats and other soil mixes *In* 4th International Peat Congress, Otaniemi, Finland. pp. 221-230.
- Meyer, J.R., and Linderman, R.G. 1986. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. Soil Biol. Biochem. 18: 191-196.
- Morandi, D., Bailey, J.A., and Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Physiol. Plant Pathol. 24: 357-364.
- Perrin, R. 1990. Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soil-borne fungi. Soil Use Manage. 6: 189-195.
- Rosendahl, C., and Rosendahl, S. 1990. The role of vesicular-arbuscular mycorrhiza in controlling damping-off and growth reduction in cucumber caused by *Pythium ultimum*. Symbiosis 9: 363-366.
- Rosendahl, S. 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. Phytopathol. Z. 114: 31-40.
- SAS Institute Inc. SAS/STAT™ Guide for personal computers. 1987, SAS Institute Inc.: Cary, NC. 1028 p.

- Schönbeck, F. 1979. Endomycorrhiza in relation to plant diseases *In* Soil-Borne Plant Pathogens. *Edited by* B. Schippers, and W. Gams. Academic Press, London New York San Francisco. pp. 271-280.
- Secilia, J., and Bagyaraj, D.J. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can. J. Microbiol.* 33: 1069-1073.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C., and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Smith, G.S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374.
- Smith, G.S., Hussey, R.S., and Roncadori, R.W. 1986. Penetration and postinfection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradices* and phosphorus. *J. Nematol.* 18: 429-435.
- Spanu, P., and Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119-124.
- STSC Inc. *Statgraphics user's guide*. 1988, STSC Inc.: Rockville. 886 p.
- Wyss, P., Boller, T., and Wiemken, A. 1989. Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 451-456.

## *Chapitre 4*

### ***Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots***<sup>3</sup>

Afin de tester l'hypothèse d'une interaction directe entre le mycélium EVA et un autre microorganisme, nous avons conçu un système de culture *in vitro* compartimenté permettant d'obtenir un mycélium de champignon EVA aseptique et séparé de l'influence des racines hôtes. Ce système nous a en outre permis d'augmenter de façon marquée la sporulation en conditions aseptiques. Nous présentons ces résultats dans ce quatrième chapitre. Ces observations ont servi de base à l'obtention d'un brevet US.

---

<sup>3</sup> Ces résultats ont été publiés sous forme d'article et ont servi de base à l'obtention d'un brevet US:

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1996b. Enhanced hyphal and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycological Research* **100**: 328-332.

Fortin, J.A., St-Arnaud, M., Hamel, C., Chavarie, C. et Jolicoeur, M. 1996. *In vitro* production of mycorrhizal inoculum. *US Patent Number 5,554,530*.

## Résumé

Les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules (MVA) sont écologiquement importants pour la plupart des plantes vasculaires en raison de leurs effets bénéfiques sur la croissance et la survie de leur hôte. Leur nature d'organisme biotrophe obligatoire impose cependant des limitations pour la production d'inoculats pouvant servir dans la gestion de cette symbiose en agriculture. Le *Glomus intraradices* a été cultivé sur des racines du *Daucus carota* transformées génétiquement, dans un système de culture *in vitro* à deux compartiments. La croissance des racines mycorhizées a été limitée au premier compartiment (proximal) contenant un milieu nutritif complet. Seule la croissance de l'endosymbiote a été permise sur le second compartiment (distal) qui contenait le même milieu moins le sucre. La colonisation du compartiment distal par le mycélium a débuté entre six et huit semaines après le repiquage de racines mycorhizées dans le compartiment proximal. La densité des hyphes et des spores a été significativement plus élevée dans le compartiment distal. On a dénombré jusqu'à 34 000 spores dans le compartiment distal de chaque vase de Petri, avec une moyenne de 15 000 spores viables dans une forte proportion. Cela ouvre la possibilité de produire des spores aseptiques non seulement pour les besoins de la recherche, mais aussi pour la production d'inoculats à grande échelle. Les facteurs potentiellement impliqués dans l'accroissement de la densité des hyphes et des spores, ainsi que leurs rôles écologiques sont discutés.

**Mots-clés:** VAM - sporulation - inoculum - Glomales



## Summary

Arbuscular mycorrhizal (AM) fungi are ecologically important for most vascular plants because they benefit plant growth and survival. The obligate biotrophic nature of AM fungi imposes limitations in inoculum production which could be used in the management of the symbiosis in field crops. *Glomus intraradices* was grown on genetically transformed *Daucus carota* roots in a two compartment *in vitro* system. The growth of mycorrhizal roots was restricted to one compartment (proximal) containing a complete growth medium. Only the endosymbiont was permitted to grow onto the second compartment (distal) containing the same medium lacking sugar. Colonization of the distal compartment by the mycelium took place between six to eight weeks after subculturing the mycorrhizal roots in the proximal compartment. Hyphal- and spore-densities were significantly higher in the distal compartment. Up to 34 000 spores with a mean of 15 000 mostly viable spores per plate were counted in the distal compartment. This opens the possibility of producing aseptic spores, not only for research purposes but also for large scale inoculum-production. The possible factors involved in the enhancement of hyphal- and spore-densities and their ecological role are discussed.

**Keywords:** VAM - sporulation - inoculum - Glomales

## Introduction

An intimate relationship between vascular plants and arbuscular mycorrhizal (AM) endophytes has developed over the course of 400 million years of coevolution (Remy et al. 1994; Simon et al. 1993). These micro-organisms are ecologically important for most vascular plants because they benefit plant growth and survival.

Considering the obligate biotrophic nature of AM fungi, the difficulties in inoculum production has imposed a major limitation to the management of the symbiosis in agriculture. Until now, AM fungi inoculum has mostly been produced on greenhouse-grown plants. Usually, chopped mycorrhizal roots, often mixed with the growth media which contains hyphae and spores, are used to inoculate new plants. This type of inoculum may contain contaminants. Other methods such as the aeroponic culture (Hung and Sylvia 1988; Sylvia and Hubbell 1986) and alginate encapsulation of root fragments (Strullu and Plenchette 1990) have been developed in an attempt to increase the quality and reliability of the inoculum. However, the production of propagules under aseptic conditions remains the most promising way to produce large amounts of high quality pathogen-free AM fungal inoculum desirable for introduction into field crops used in agriculture.

AM fungal infection under *in vitro* conditions was first reported in the early 1960s (Mosse 1962), when the presence of *Pseudomonas* was considered necessary to ensure colonization. By the early 1970s, a bacteria-free symbiosis was achieved (Mosse 1972; Phillips 1971). Since this pioneer work, the *in vitro* culture of AM fungi has been successful for a limited number of species (Bécard and Fortin 1988; Diop et al. 1994; Mosse and Hepper 1975; Mugnier and Mosse 1987b). Knowledge of the growth requirements and biology of these species has been greatly improved by the use of *in vitro* techniques (Bécard and Piché 1989a, 1989b; Bécard and Piché 1992; Chabot et al. 1992a). Concerned primarily with the interactions between AM fungi and fungal root pathogens, we were interested to look at the direct effect of an active extraradical phase of a VAM fungus, in symbiosis with the host root, on one microorganism in the absence of

interference from the host plant roots and other microorganisms. Therefore, an *in vitro* experimental system in which AM fungus–pathogen interactions are isolated from the host roots or other micro-organisms was needed. Following modifications to the *in vitro* system, we observed marked increases in AM fungal development. These findings may constitute a key to the development of an industrial-scale production of AM inoculum. The purpose of this paper is to report these new observations.

## Materials and methods

Ri T-DNA transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots were grown on a minimal (M) medium previously described by Bécard & Fortin (1988) but solidified with 0.4% (w/v) gellan gum (ICN Biochemical Inc., Cleveland, Ohio 44128) instead of 1% (w/v) Bacto-agar (modified M). Spores of an isolate of *Glomus intraradices* N. C. Schenck & G. S. Sm. (DAOM 181 602) were recovered from calcined montmorillonite clay (IMC Imcore, Division of International Minerals and Chemical Corporation, Mundelein, Illinois 60060) in which mycorrhizal leeks (*Allium porrum* L.) were grown. The fungus was first isolated in 1978 by Dr V. Furlan from the roots of a *Fraxinus americana* L. growing in a nursery at Pont-Rouge, Québec, Canada. The spores were extracted by density gradient centrifugation in diatrizoate meglumine (Winthrop laboratories, Division of Sterling Drug Ltd., Aurora, Ontario, Canada), after wet sieving the soil. The spores were then washed by centrifugation for 1–2 min in sterile distilled water containing a drop of Tween 80, surface sterilized twice by soaking for 10 min in a vacutainer-tube containing 2 % (w/v) chloramin T, and rinsed five times for 1–2 min in a solution containing 1 % (w/v) streptomycin sulfate and 0.5 % (w/v) gentamycin sulfate. The spores were kept overnight at 4°C in the antibiotic solution. The surface sterilization procedure was repeated. The spores were then spread on a 1.5 % (w/v) water agar plate.

Mycorrhizal colonization of transformed carrot roots was initiated on the modified M medium. Infection was achieved by placing 10–15 spores of *G. intraradices* near the apex of a 2 cm long carrot root piece. The Petri plates were incubated in the dark at 27°C. The plates in which the VAM fungus has reached the root and was growing and sporulating around root segments were selected for subculturing onto fresh modified M medium in order to produce a stock of mycorrhizal roots.

Two-compartment 100 × 15 mm Petri dishes were used (Figure 3). One compartment was filled up to the top level of the dividing wall with 25 ml of modified M medium while the other compartment received only 8 ml of modified M medium lacking sucrose. After solidification of the gel, another 1 ml of the sugarless medium was pipetted into the same

compartment and the Petri dishes were placed at an angle in order to form a slope against the dividing wall, from 0.5 to 1 mm of the wall top down to the sugarless medium.

Mycorrhizal *D. carota* transformed roots were inoculated on the compartment containing sucrose (proximal compartment). The dishes were incubated upside down at a 45° angle in the dark at 27°C until the mycelium had crossed the central wall and had grown on the distal compartment to cover all the area. The cultures were examined weekly and the roots were trimmed as needed in order to prevent their growth in the distal compartment.

As the Petri dishes were prepared primarily for the purpose of AM fungus–root pathogen mycelial confrontation, the dishes from which were taken the observations reported in this paper were selected in seven repetitions in time, from a stock of cultures prepared each second week. The dishes were selected when the entire distal compartment was colonized with the *G. intraradices* mycelium and were 8–15 wk old from inoculation. Two Petri dishes were used in each of the first four repetitions and three Petri dishes in each of the following three repetitions. As the initial inoculation dates and consequently the growth periods were not strictly identical between dishes used in every repetition, each of the seventeen Petri dishes used was considered as a block in the statistical analysis of AM fungal growth in the proximal and distal compartments of the dishes. Measurements of hyphae and spore densities were taken after colonization of the entire distal compartment

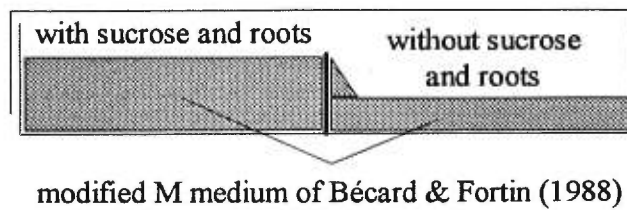
Density of *G. intraradices* hyphae was estimated by positioning a cross-ruled reticule eyepiece perpendicular to an imaginary line running parallel to the central wall, at a 2 cm distance from it. Three equivalent predetermined positions in each compartment were used for the first four repetitions. The first measurement was made at the center of the imaginary line, and the two others were 3 cm on each side from this point. In the last three repetitions, six predetermined positions were used. Three pairs of two measurements, 1 cm from each other, were used, along the same axis, instead of the three single measurements used previously at each predetermined position. For each measurement, the number of hyphae crossing a 9.8 mm line on the reticule was counted at 12 × magnification on a stereoscopic microscope.

Spore density was estimated at  $6 \times$  magnification by counting the number of spores inside three  $14.6 \times 1.5$  mm rectangles which were positioned as described for the measurement of hyphal density.

Viability of the spores formed in the distal compartment was determined by 40 h staining in 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (An and Hendrix 1988) of samples of 100 spores taken from five nine month old cultures. Controls were performed with equivalent but autoclaved (15 min, 121 °C) spore-samples. The spores were previously separated from the gellan gel by solubilization of the medium in 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0, 30 °C) (Doner and Bécard 1991) and washed in distilled water.

Statistical analyses were performed with SAS statistical software (SAS Institute Inc. 1992). The differences in hyphae and spore densities between proximal and distal compartments were investigated by analysis of variance after rank transformation of the hyphae and spore data, to meet the requirements of the analysis of variance, and by the sign test for paired comparisons (Lehmann 1975).

**Figure 3.** Diagram of the two-compartment growing system used. Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots were inoculated in the proximal compartment (left side) and only the *G. intraradices* mycelium was allowed to grow in the distal compartment (right side).



## Results and discussion

Colonization of the rootless distal compartment by the AM fungus mycelium generally took place between six to eight weeks after inoculating the mycorrhizal roots in the proximal compartment. The fungus normally grew to the central wall in the first 4 wk and crossed the wall with a 1 or 2 wk delay. When at least one hypha had crossed into the rootless side, the mycelium started to grow very vigorously, forming a conspicuous hyphal front and colonizing the entire compartment within 2 wk (Figure 4A). The density of hyphae and spores in the rootless compartment continued to increase for 3–4 months. This often coincided with a considerable slowing down in the growth rate and browning of the transformed roots in the proximal compartment. Spores were formed and matured concurrently with mycelium growth. At the beginning, spores were all translucent to whitish and turned yellow to brownish after some months. Soon after the beginning of colonization in the distal compartment, mycelium density was obviously greater than in the proximal compartment (Figure 4B). In fact, the measured hyphal densities were up to six times higher in the distal compartment (Table XIV) while the spore densities were up to 17 times higher in the rootless compartment than in the proximal one (Table XV). Both ANOVA and sign test for paired comparisons demonstrated significant differences in hyphal and spore densities between proximal and distal compartments. Spore viability in the rootless compartment of five 9-month-old Petri dishes was 82 % with a standard deviation of 5.5 %.

There has been an interest for the production of aseptic spores of AM fungus, mainly for research purposes for more than a decade. In 1984, the production of 3–5 newly formed *Gigaspora margarita* spores per Petri dish of tomato root cultures was reported (Millar-Wideman and Watrud 1984). Four years later, modifying the host and growth parameters, Bécard and Fortin (1988) reported 100 spores per plate of the same AM species and this number was further increased to 450 (Diop et al. 1992). Recently, Diop et al. (1994) working with *G. intraradices* and *G. versiforme* associated with excised tomato roots reported the production of 100–1000 aseptic mature spores per dish. In the present study, up to 34 000 spores with a mean of 15 000 spores per plate were counted in the root-free compartment. As a large proportion of these spores is



viable and could easily be recovered from the growth medium, this opens the possibility of producing aseptic spores, not only for research purposes but also for large scale inoculum-production.

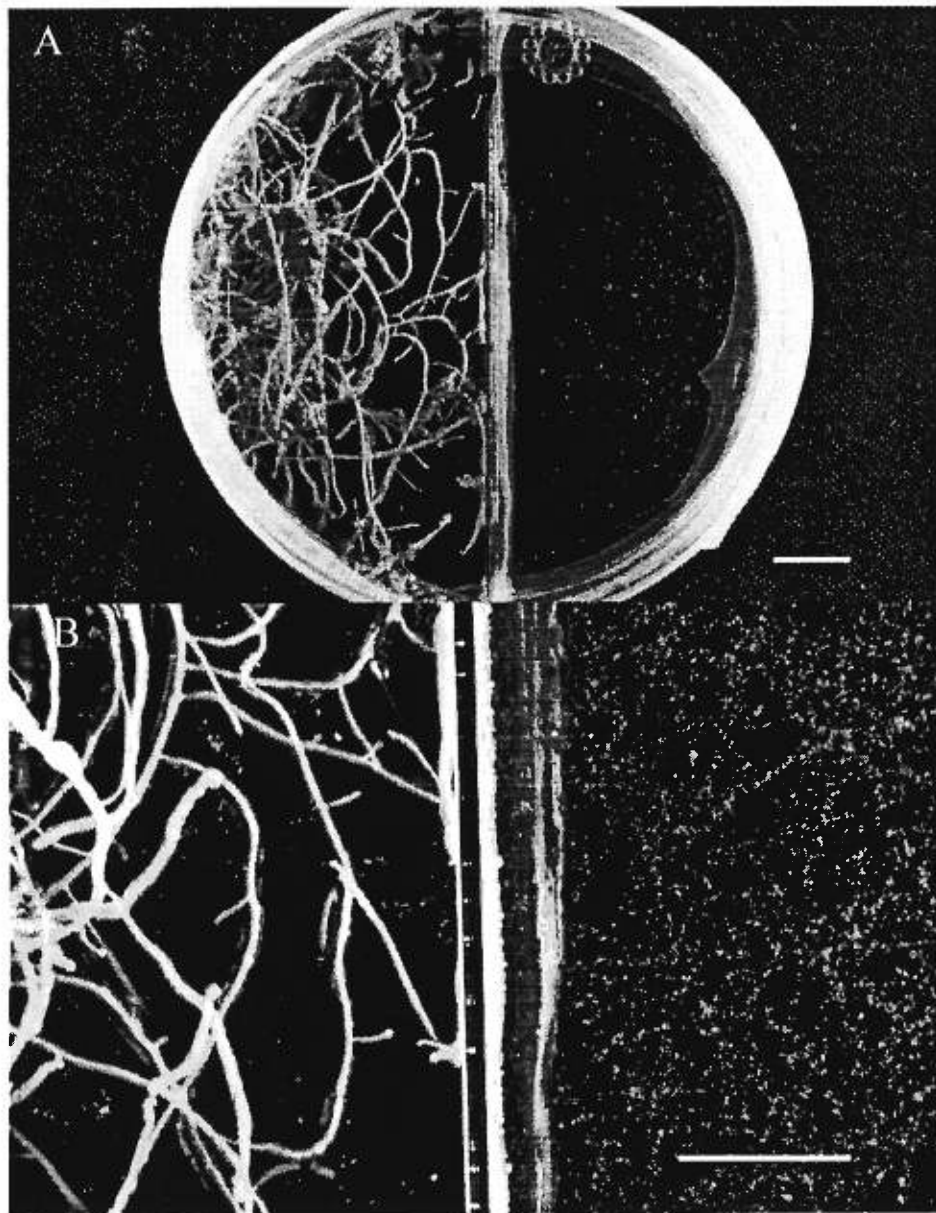
Stimulatory factors involved in the enhancement of hyphal and spore densities in the distal compartment could be associated with the absence of sucrose, with the thinner growth medium (easier diffusion of gas) or with the physical exclusion of diffusible exudates from the host roots. We postulate that the relief of root induced growth repression is a major cause of the observed results.

Recently, many flavonoids were found to significantly enhance or inhibit the AM fungi spore germination, hyphal growth or symbiosis formation (Chabot et al. 1992b; Gianinazzi-Pearson et al. 1989; Nair et al. 1991; Siqueira et al. 1991; Tsai and Phillips 1991). Among the tested molecules, quercetin was pointed out as a highly stimulatory flavonoid which had a synergetic effect with carbon dioxide. Axenic growth of *Gi. margarita* can be obtained in the presence of quercetin for up to six weeks (Bécard et al. 1992). These previous observations lead to the hypothesis that flavonoids are one of the main factors implicated in early recognition between symbionts and in symbiosis formation.

We further suggest that root exudates could also play another ecological role. It is possible that bioactive substances in root exudates (e.g. flavonoids) could have different effects on different AM fungal structures. Higher concentrations (near roots) could promote spore germination and the development of infective structures and runner hyphae, while repressing the formation of spores and highly branched absorptive hyphal networks in the vicinity of roots. The absorptive mycelium and spores would rather be produced farther from the influence of roots in areas of the soil where the nutrient level is higher and where the occupancy is lower. This hypothesis is in agreement with the direct observations on mycelium architecture in soil (Friese and Allen 1991).

In conclusion, sporulation and hyphal density of this isolate of *Glomus intraradices* were enhanced *in vitro* in a two-compartment culture system when the mycelium was physically separated from *Daucus carota* Ri T-DNA transformed roots.

**Figure 1.** Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots (A) The compartmentalized system showing carrot roots growing along with the *G. intraradices* mycelium in the proximal compartment (left side), and the AM fungus hyphae and spores colonizing the rootless distal compartment (right side). (B) Close-up at the dividing wall showing the density of hyphae and spores obtained in the distal compartment. Bars = 1 cm.



**Table XIV.** Hyphal density in the root-fungus (proximal) compartment and in the fungus-only (distal) compartment. The symbiosis was formed between *Glomus intraradices* and Ri-T DNA transformed *Daucus carota* roots.

Petri dish	Hyphal density (per mm) <sup>1</sup>	
	Compartment	
	Proximal	Distal
1	1.97 ± 0.22	6.33 ± 1.64
2	3.95 ± 1.36	14.86 ± 0.86
3	4.93 ± 0.73	9.32 ± 0.68
4	6.26 ± 1.57	12.48 ± 1.37
5	3.25 ± 0.44	8.05 ± 1.34
6	6.67 ± 1.56	8.12 ± 2.50
7	1.56 ± 0.56	5.87 ± 3.38
8	2.18 ± 0.82	4.80 ± 2.75
9	1.58 ± 0.37	4.56 ± 1.15
10	1.52 ± 0.06	2.98 ± 1.42
11	1.11 ± 0.42	1.64 ± 0.36
12	1.73 ± 0.45	6.37 ± 1.24
13	0.91 ± 0.20	5.20 ± 0.74
14	1.49 ± 0.23	6.55 ± 0.85
15	1.11 ± 0.16	6.93 ± 1.32
16	1.61 ± 0.52	4.56 ± 0.72
17	1.70 ± 0.38	5.20 ± 1.21
Mean <sup>2</sup>	2.56 ± 0.29 <sup>a</sup>	6.70 ± 0.55 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Mean ± standard error of mean (calculated from three measurements by compartment for replicated 1-12 and from six for 13-17)

<sup>2</sup> Means of proximal and distal compartments were significantly different after both Anova ( $P < 0.0001$ ) and sign test for paired comparisons ( $P < 0.0001$ ).

**Table XV.** Spore density in the root-fungus (proximal) compartment and in the fungus-only (distal) compartment. The symbiosis was formed between *Glomus intraradices* and Ri-T DNA transformed *Daucus carota* roots.

Petri dish	Spore density (per mm <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	
	Compartment	
	Proximal	Distal
1	1.25 ± 0.24	5.14 ± 1.39
2	2.15 ± 1.09	2.94 ± 0.67
3	4.57 ± 0.54	6.33 ± 2.51
4	2.80 ± 0.85	8.74 ± 1.67
5	3.93 ± 1.48	5.79 ± 2.04
6	1.95 ± 0.87	4.89 ± 0.88
7	2.85 ± 0.32	3.22 ± 1.89
8	2.77 ± 0.81	1.98 ± 1.39
9	0.67 ± 0.16	2.73 ± 0.91
10	3.40 ± 1.26	6.13 ± 5.66
11	2.43 ± 0.63	2.28 ± 0.99
12	1.77 ± 0.27	3.33 ± 0.45
13	0.13 ± 0.02	2.24 ± 1.00
14	1.05 ± 0.35	1.70 ± 0.38
15	0.63 ± 0.24	3.34 ± 2.02
16	1.30 ± 0.70	3.54 ± 2.06
17	1.83 ± 0.51	2.58 ± 1.26
Mean <sup>2</sup>	2.09 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.94 ± 0.48 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Mean ± standard error of mean (calculated from three measurements by compartment)

<sup>2</sup> Means of proximal and distal compartments were significantly different after both Anova (P=0.0044) and sign test for paired comparisons (P=0.0012).

## Acknowledgement

Ri T-DNA transformed carrot roots were kindly provided by Dr. Y. Piché, Université Laval, Recherche en sciences de la vie et de la santé, Pavillon C.E. Marchand, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4. Spores of *G. intraradices* were kindly provided by Dr. V. Furlan, Agriculture Canada, 2560 boul. Hochelaga, Sainte-Foy, Québec, Canada G1V 2J3. We also wish to thank L. Dumont for technical work, S. Daigle for advise on experimental design and statistical analysis, and L. Nantais for the revision of the linguistic content of the paper. This research was supported by an NSERC operating grant awarded to J. A. Fortin.

## Literature cited

- An, Z.Q., and Hendrix, J.W. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261.
- Bécard, G., Douds, D.D., and Pfeffer, P.E. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 821-825.
- Bécard, G., and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard, G., and Piché, Y. 1989a. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2320-2325.
- Bécard, G., and Piché, Y. 1989b. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* 112: 77-83.
- Bécard, G., and Piché, Y. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology *In* *Techniques for the study of mycorrhiza*. Edited by J. Norris, D. Read, and A. Varma. Academic Press, New York. pp. 89-108.
- Chabot, S., Bécard, G., and Piché, Y. 1992a. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321.
- Chabot, S., Bel-Rhlid, R., Chênevert, R., and Piché, Y. 1992b. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytol.* 122: 461-467.
- Diop, T.A., Bécard, G., and Piché, Y. 1992. Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. *Symbiosis* 12: 249-259.

- Diop, T.A., Plenchette, C., and Strullu, D.G. 1994. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5: 17-22.
- Doner, L.W., and Bécard, G. 1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol. Techniques* 5: 25-28.
- Friese, C.F., and Allen, M.F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: Inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* 83: 409-418.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B., and Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Hung, L.-L., and Sylvia, D.M. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 353-357.
- Lehmann, E. 1975. *Nonparametrics - Statistical Methods Based on Ranks*. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, CA.
- Millar-Wideman, M.A., and Watrud, L.S. 1984. Sporulation of *Gigaspora margarita* in root cultures of tomato. *Can. J. Bot.* 30: 642-646.
- Mosse, B. 1962. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. *Rothamsted Experimental Station Report for 1961*. p. 80.
- Mosse, B. 1972. Growth of Endogone mycorrhiza in agar medium. *Rothamsted Experimental Station Report for 1971*. p. 93.
- Mosse, B., and Hepper, C.M. 1975. Vesicular-arbuscular infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 215-223.
- Mugnier, J., and Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045-1050.
- Nair, M., Safir, G., and Siqueira, J. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.



- Phillips, J.M. 1971. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. *Rothamsted Experimental Station Report for 1970*. p. 88.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H., and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841-11843.
- SAS Institute Inc. 1992. *The SAS System for Windows 3.10, release 6.08*. SAS Institute Inc.: Cary, NC.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C., and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Siqueira, J.O., Safir, G.R., and Nair, M.G. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.* 118: 87-93.
- Strullu, D.-G., and Plenchette, C. 1990. Encapsulation de la forme intraracinaire de *Glomus* dans l'alginate et utilisation des capsules comme inoculum. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Série III: Sciences de la Vie* 310: 447-452.
- Sylvia, D.M., and Hubbell, D.H. 1986. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259-267.
- Tsai, S., and Phillips, D. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1485-1488.

## **Chapitre 5**

### ***Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots***<sup>4</sup>

À l'aide du système de culture *in vitro* compartimenté mis au point précédemment, nous étudions dans ce chapitre l'interaction directe entre le mycélium EVA et un autre microorganisme.

---

4 Ces résultats ont fait l'objet d'une communication à un congrès international et ont été publiés sous forme d'article:

St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1993b. Direct *in vitro* mycelial interaction between an arbuscular mycorrhizal fungus growing on *Daucus carota* transformed roots, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* Dans Proceedings of the Ninth North American Conference on Mycorrhizae, Guelph. p. 137.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1995b. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* 5: 431-438. © Springer-Verlag 1995

## Résumé

Les champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules peuvent entraîner la réduction des symptômes de maladies et de la population de microorganismes pathogènes par des mécanismes encore mal compris. Le *Glomus intraradices* a été cultivé sur des racines transformées du *Daucus carota* dans un système de culture *in vitro* à deux compartiments. Le premier compartiment contenait des racines mycorhizées et un milieu de culture complet, tandis que le second compartiment contenait le même milieu sans sucre et sur lequel la croissance du mycélium seule était obtenue. L'interaction directe entre le *G. intraradices* et le *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* a été étudiée dans le compartiment sans sucre durant une période de cinq jours. La densité des hyphes et des spores du *G. intraradices*, ainsi que la germination des conidies, la croissance du mycélium et la production de nouvelles spores du *F. oxysporum chrysanthemi* ont été estimés. Cinq heures après l'inoculation, la germination des conidies du *F. o. chrysanthemi* a été doublée en présence du *G. intraradices*. La croissance radiale des colonies du *F. o. chrysanthemi* a toujours été légèrement mais significativement accrue en présence du *G. intraradices*. Aucune corrélation n'a été observée entre la densité des hyphes ou des spores du *G. intraradices* et la croissance mycélienne du *F. o. chrysanthemi*. De façon globale, la sporulation des colonies du *F. o. chrysanthemi* âgées de cinq jours n'a pas été influencée par la présence du *G. intraradices*. Cependant, une corrélation négative significative a été trouvée entre la production de conidies par le *F. o. chrysanthemi* et la densité des hyphes et des spores du *G. intraradices*. Le *G. intraradices* a augmenté la germination des conidies du *F. o. chrysanthemi* et a légèrement stimulé sa croissance mycélienne en co-culture dans un système qui exclut toute influence des racines. Aucune antibiose n'a été observée entre les deux champignons. La signification des résultats et des hypothèses sur leur implication potentielle dans la biologie de la rhizosphère sont discutés.

**Mots-clés:** Pathogen - Biological control - Spore - Conidia - Germination - VAM

## Summary

Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi can reduce plant disease symptoms and populations of pathogens through mechanisms that are not well understood. *Glomus intraradices* was grown on *Daucus carota* transformed roots in a two-compartment *in vitro* system. One compartment contained mycorrhizal roots on a complete growth medium, while the other contained a medium lacking sugar on which only mycelial growth was allowed. The direct interaction between *G. intraradices* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* was studied in the compartment lacking sugar during a five-day period. *G. intraradices* hyphal density and spore number were estimated along with *F. o. chrysanthemi* conidial germination, mycelial growth and sporulation. Five hours after inoculation, germination of *F. o. chrysanthemi* conidia doubled in the presence of *G. intraradices*. Radial growth of *F. o. chrysanthemi* colonies were always slightly, but significantly enhanced in the presence of *G. intraradices*. No correlation was obtained between *G. intraradices* hyphae or spore densities and the *F. o. chrysanthemi* hyphal growth. Overall sporulation of the five day-old *F. o. chrysanthemi* colonies was not influenced by the presence of *G. intraradices*. However, significant negative correlations were found between *F. o. chrysanthemi* conidia production and *G. intraradices* hyphae or spore concentrations. *G. intraradices* increased *F. o. chrysanthemi* conidial germination and slightly stimulated its hyphal growth in dual culture without any root influences. No antibiosis was observed between the fungi. Significance of the results and hypothesis on their potential implication in rhizosphere biology are discussed.

**Keywords:** Pathogen - Biological control - Spore - Conidia - Germination - VAM

## Introduction

Vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi can reduce plant root disease symptoms and pathogen populations in soil through mechanisms that are not well understood (Caron 1989a; Dehne 1982; Graham 1986; Linderman 1994; Perrin 1990; Schönbeck 1979). Their action has been attributed to improvement of plant nutrition, to stimulation of host plant disease resistance mechanisms, to a direct interaction with pathogens, and to an indirect effect through changes in soil microflora.

Improvement of phosphorus assimilation alone cannot always explain the beneficial effects of VAM fungi on host plants which lead to reduction of disease symptoms or pathogen population in soil (Caron et al. 1986c; St-Arnaud et al. 1994b). Induction of disease resistance mechanisms by the mycorrhizal fungus in host plants is controversial. The synthesis of compounds implicated in physical or chemical resistance to pathogen infection has been observed in response to mycorrhizal colonization (Baltruschat and Schönbeck 1975; Dehne and Schönbeck 1979b; Dehne et al. 1978; Grandmaison et al. 1993; Harrison and Dixon 1993; Krishna and Bagyaraj 1983; Lieberei and Feldmann 1989; Morandi et al. 1984), but the absence of any stimulation of defence mechanisms in mycorrhizal plants has also been reported (Codignola et al. 1989; Dumas et al. 1989, 1990; Gianinazzi-Pearson et al. 1992; Spanu and Bonfante-Fasolo 1988; Wyss et al. 1989).

A direct or an indirect competitive effect could exist near the extraradical phase of the VAM fungus. Shifts in the presence or abundance of microbial species are known to occur in the rhizosphere of mycorrhizal plants (Ames et al. 1984; Bagyaraj and Menge 1978; Linderman 1992; Meyer and Linderman 1986b; Secilia and Bagyaraj 1987), and other significant parameters, such as the spatial distribution of these organisms, may also be strongly influenced by mycorrhizal fungi (Linderman and Paulitz 1990). Many studies have demonstrated that the interaction between VAM fungi and other rhizosphere inhabitants can be detrimental either to the VAM fungi (Krishna et al. 1982), to the other microorganisms (Paulitz and Linderman 1989), or to pathogens (Meyer and Linderman

1986b; Secilia and Bagyaraj 1987) or, in contrast, can be favorable to VAM fungi and to their host plants (Meyer and Linderman 1986a; Oliveira et al. 1987).

The few studies dealing with the interaction between soil microorganisms and VAM fungi in the absence of interference from the host plant (Azcón 1987; Azcón-Aguilar et al. 1986; Calvet et al. 1992; Mayo et al. 1986; Mugnier and Mosse 1987a) were limited to the effect of the microbes on germination, hyphal growth or sporulation of the VAM fungus. To our knowledge, no study has looked at the effect of an active extraradical phase of a VAM fungus, in symbiosis with the host root, on one microorganism in the absence of interference from the host plant roots and other microorganisms.

Benhamou et al. (1994) have successfully exploited the *in vitro* system of excised root culture, developed by Bécard and Fortin (1988), to isolate the effect of mycorrhizal colonization of roots on plant disease processes. We have also modified and adapted this *in vitro* system to isolate the interaction between mycorrhizal fungi and other microorganisms. The purpose of this research was to test the effect of the *Glomus intraradices* Schenck & Smith mycelium on *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *chrysanthemi* G.M. & J.K. Armstrong & Littrell conidial germination, mycelial growth and sporulation, in a situation in which other influences were minimized.

## Materials and Methods

### RI T-DNA TRANSFORMED CARROT ROOTS AND FUNGAL CULTURES

Ri T-DNA transformed carrot (*Daucus carota* L.) roots were provided by Dr. Yves Piché (Université Laval, Recherche en sciences de la vie et de la santé, Pavillon C.E. Marchand, Université Laval, Québec, Canada). Transformed carrot roots were maintained on a minimal medium (M medium) previously described by Bécard and Fortin (1988) but solidified with 0.4% (w/v) gellan gum (ICN Biochemical Inc., Cleveland, Ohio) instead of 1% (w/v) bacto-agar (modified M medium).

The root pathogen *F. o. chrysanthemi* (ATCC 66 279) was routinely grown on potato-dextrose agar (Difco) in darkness at 25°C.

Spores of *G. intraradices* (DAOM 181 602), which were provided by Dr. Valentin Furlan (Agriculture Canada, 2560 boul. Hochelaga, Sainte-Foy, Québec, Canada), were recovered from calcined montmorillonite clay (IMC Imcore, Division of International Minerals and Chemical Corporation, Mundelein, Ill.) in which mycorrhizal leeks (*Allium porrum* L.) were grown. The spores were extracted by density gradient centrifugation in diatrizoate meglumine (Winthrop, Aurora, Ontario, Canada), after wet sieving of the soil. The spores were then washed by centrifugation for 1–2 min in sterilized distilled water containing a drop of tween 80, surface sterilized twice by soaking for 10 min in 2% (w/v) chloramin T in a vacutainer-tube, and rinsed five times for 1–2 min in a solution containing 1% (w/v) streptomycin sulfate and 0.5% (w/v) gentamycin sulfate. The spores were kept overnight at 4°C in the antibiotic solution and the surface sterilization procedure was then repeated. The spores were finally spread on a 1.5% (w/v) water agar plate.

## ESTABLISHMENT OF MYCORRHIZAL COLONISATION

Mycorrhizal colonization of transformed carrot roots was initiated on modified M medium by placing 10–15 spores of *G. intraradices* near the apex of a 2-cm-long carrot root piece. Plates were then incubated in the dark at 27°C. The medium in plates in which the mycorrhizal fungus had reached the root and was growing and forming spores around root segments were subdivided into 4–8 pieces containing at least one vigorous root apex obviously colonized; these were replated on fresh modified M medium to constitute a stock of mycorrhizal roots.

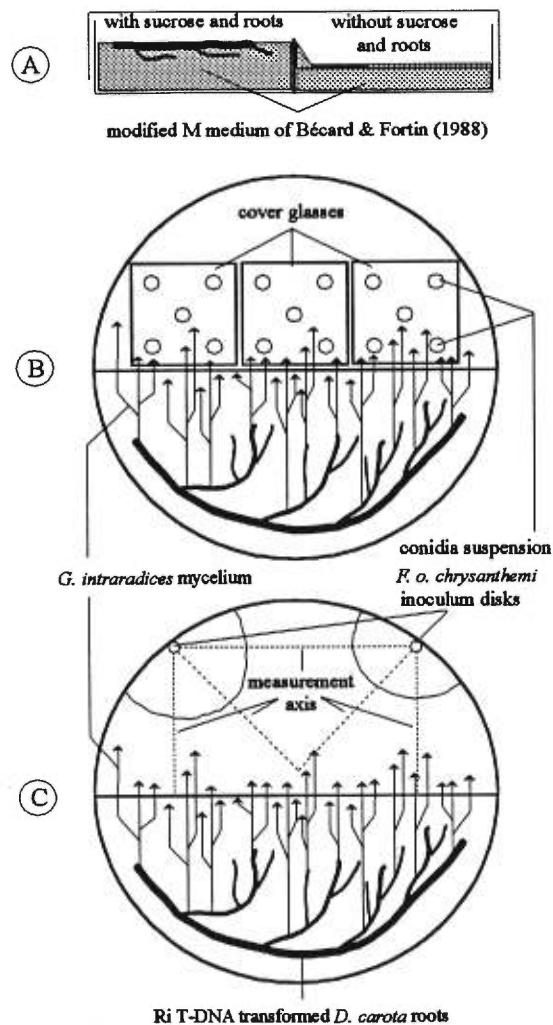
## DESCRIPTION OF THE EXPERIMENTAL UNITS

Two-compartment 100 × 15-mm Petri dishes were used as experimental units. One compartment was filled to the top level of the dividing wall with 25 ml of modified M medium (Figure 5A). The other compartment was treated as follows: (1) in the germination experiments, the second compartment received 8 ml of modified M medium lacking sucrose and, after solidification of the gel, three sterile 22 × 22-mm microscope cover glasses were placed along the central wall, and a further 3 ml of modified M medium lacking sugar was poured over the cover glasses. After solidification of this second layer of gel, a further 1 ml of the sugarless medium was pipetted into the same compartment and the Petri dishes were placed at an angle in order to form a slope 0.5–1 mm from the wall top down to the sugarless medium (Figure 5A, B); (2) in the mycelium growth and sporulation experiments, the second compartment was as described before, except that no cover glasses were added (Figure 5A, C).

Mycorrhizal *D. carota* transformed roots were transferred on the compartment containing sucrose. Non-VAM roots were used as control. The cultures were incubated in the dark at 27°C for 5–10 weeks, until a dense mycorrhizal mycelium bearing numerous spores was obtained in the Petri dish compartment lacking sugar. The cultures were examined weekly and the roots were trimmed as needed in order to exclude them from the medium lacking sugar.



**Figure 5A-C.** Two-compartment Petri dishes were used as experimental units. **A.** Mycorrhizal Ri T-DNA transformed *D. carota* roots were inoculated in one compartment and only the *G. intraradices* mycelium was allowed to colonized the second compartment medium. **B.** In the germination experiments, three cover glass were placed in the rootless compartment and were covered with the growing medium; five drops of the *F. o. chrysanthemi* conidia suspension were inoculated over each cover glass. **C.** In the mycelium growth and sporulation experiments, no cover glasses were added in the second compartment and two *F. o. chrysanthemi* inoculum disks were transferred in each Petri dish.



#### F. O. CHRYSANTHEMI INOCULATION AND MEASUREMENTS TAKEN

In germination experiments, the compartment lacking sugar was inoculated with a conidial suspension. The conidia had been obtained by pouring 5 ml of sterile distilled water over a 3-day-old *F. o. chrysanthemi* colony growing on sucrose nutrient agar (Nirenberg 1981) and gently rotating the dish. The suspension was collected in a sterile, conical centrifuge tube, homogenized for 30 s with a vortex and spore concentration determined using a hemacytometer. Spore concentrations were adjusted to 150 000, 120 000, 1 300 000, and 830 000 spores per ml for experiment 1–4, respectively. In each Petri dish, five distinct 10  $\mu$ l-drops of the spore suspension were inoculated on the sugarless medium over each of the three cover glasses, following a quinconx arrangement (Figure 5B). Two *G. intraradices*-colonized Petri dishes and two uncolonized dishes were inoculated in each of the four experiments. As the *G. intraradices* mycelium density varied in the rootless compartment area of each Petri dish as well as among Petri dishes, density measurements of hyphae and spores were done in order to assess this source of variability. The density of *G. intraradices* hyphae was estimated by positioning a crossruled reticule eyepiece in the center of each cover glass at  $\times 12$  magnification on a Wild M-8 stereoscopic microscope and counting the number of hyphae crossing a 9.8-mm line on the reticule. The density of *G. intraradices* spores was estimated at  $\times 6$  magnification by counting the number of spores inside a 14.6  $\times$  1.5-mm rectangle centered on each cover glass. Plates were not sealed but were placed in a closed, transparent plexiglass box and incubated at 20–25°C in diffuse fluorescent light for approximately 5 h, until germ tubes were obvious on germinated conidia. After the incubation period, the Petri dishes were placed at 4°C, and the coated cover glasses were taken out and mounted on a microscope slide in distilled water with a drop of lactophenol-cotton blue under a second cover glass. The percentage of germinated *F. o. chrysanthemi* conidia was determined with a Leitz Orthoplan microscope at  $\times 100$  magnification. At least 100 conidia were counted in each of the 15 spore suspension drops in each Petri dish.

In *F. o. chrysanthemi* mycelium growth and sporulation experiments, the compartment lacking sugar was inoculated with two 3-mm disks of *F. o. chrysanthemi* mycelium taken from the margin of a 5-day-old colony growing on sucrose nutrient agar. The two disks were positioned near the Petri dish outer wall at an angle of 45° and 135°, respectively, from the central dividing wall (Figure 5C). Three *G. intraradices*-colonized and three uncolonized Petri dishes were inoculated in each of six repetitions for the experiment on hyphal growth, and in each of five repetitions for the experiment on sporulation. The density of *G. intraradices* hyphae was estimated twice, as described before, along each of three axes originating from the inoculation point; the first axis ran parallel to the central wall and the other two at angles of 45° and 90° from the first. With the crossruled reticule eyepiece positioned parallel to the axis, the first estimation was made at the inoculation point and the second estimation 9.8 mm further along the same axis. The density of *G. intraradices* spores was estimated, as described before, by positioning the rectangle on each axis with one end at the inoculation point.

Inoculated plates were not sealed but were placed in a closed, transparent plexiglass box in three groups of two Petri dishes (one *G. intraradices* and one control) and incubated at 22–25°C under diffuse fluorescent light for 5 days. The growth of *F. o. chrysanthemi* hyphae was measured on each of the three axes at × 6 magnification, under dark-field illumination after 1, 2, 3, 4 and 5 days for the first four repetitions of the experiment, and after 5 days only for the fifth and sixth repetitions.

After 5 days, two 6-mm gelosis disks were cut with a stopper borer near the margin of the *F. o. chrysanthemi* colonies on each of the three axes. The two disks from each axis were put into sterile 0.12 % water agar in a conical centrifuge tube and homogenized 2 min on a vortex at maximum speed. The concentration of conidia was estimated from two 10- $\mu$ l subsamples using an hemacytometer. For each replicate, a first estimation was made of the amount of water agar required to give a density of 50–100 conidia /mm<sup>2</sup> on the hemacytometer; 5 ml were added for replicates 1 and 2, 0.5 ml for replicate 3, and 2 ml for replicates 4 and 5.

## STATISTICAL ANALYSIS

The experimental design was a randomized complete-block design with three replication factors as described before. Statistical analysis were done with Correlation and General Linear Model procedures of the SAS software (SAS Institute Inc. 1992). The effect of *G. intraradices* on *F. o. chrysanthemi* conidial germination was investigated by analysis of variance with each experiment considered as a temporal block in the ANOVA model. As the experimental conditions (temperature, germination period) were not strictly identical between experiments, the relationships between *F. o. chrysanthemi* conidia germination and *G. intraradices* hyphae and spore densities were studied separately for each experiment, with correlation analysis using the Spearman rank correlation coefficient (Lehmann 1975). The effect of *G. intraradices* on the growth of *F. o. chrysanthemi* mycelium was investigated by analysis of variance and by sign test for paired comparisons (Lehmann 1975). Square root transformation (Draper and Smith 1981) was performed for day-1, day-4 and day-5 data in order to meet the requirements of the analysis of variance. The effect of *G. intraradices* on the amount of conidia produced on the *F. o. chrysanthemi* mycelium was also investigated by analysis of variance after rank transformation of the conidia data, and by sign test for paired comparisons. The relationships between *G. intraradices* hyphae and spore densities, and *F. o. chrysanthemi* colony radius and sporulation were analysed using the Spearman rank correlation coefficient.

## Results

Germination of *F. o. chrysanthemi* conidia was significantly enhanced (ANOVA  $R^2:0.94$ ,  $P<0.01$ ) in the presence of *G. intraradices* mycelium and spores, 5 h after inoculation of the plates with the conidial suspension (Table XVI). No interaction was found between experiments and *G. intraradices* inoculation treatment ( $P=0.17$ ). In each experiment, no correlation was found between conidia germination percentage and *G. intraradices* hyphae or spore densities (Table XVII).

Growth of the *F. o. chrysanthemi* colonies was slightly but significantly greater from the first to the fifth day of dual growth (day 1: ANOVA  $R^2:0.86$ ,  $P=0.03$ ; day 2:  $R^2:0.83$ ,  $P=0.01$ ; day 3:  $R^2:0.89$ ,  $P=0.03$ ; day 4:  $R^2:0.95$ ,  $P=0.02$ ; day 5:  $R^2:0.96$ ,  $P=0.02$ ) with the *G. intraradices* mycelium (Table XVIII). A significant interaction ( $P<0.01$ ) between blocks and *G. intraradices* inoculation treatment was found for day 2-5 data. The data were also analysed using the non-parametric sign test for paired comparisons. This test confirmed the significant higher growth of the *F. o. chrysanthemi* hyphae in the presence of the *G. intraradices* mycelium for day 1 ( $P=0.02$ ) and day 5 ( $P=0.02$ ), but not for day 2-4 ( $P=0.07$ ). No correlation was found between the densities of *G. intraradices* hyphae or spores and *F. o. chrysanthemi* colony radius with the exception of day 4 at which time a significant positive correlation was found between *G. intraradices* hyphal density and *F. o. chrysanthemi* colony radius (Table XIX).

There was no overall effect of *G. intraradices* mycelium on *F. o. chrysanthemi* sporulation (ANOVA  $R^2: 0.91$ ,  $P=0.56$ ). This result was confirmed by the non-parametric sign test for paired comparisons ( $P=0.30$ ). A significant interaction ( $P<0.001$ ) was found between blocks and *G. intraradices* inoculation treatment. Moreover, a significant negative correlation was found between *F. o. chrysanthemi* conidia concentration and *G. intraradices* hyphal or spore density (Table XIX).

**Table XVI.** Germination of *Fusarium oxysporum chrysanthemi* conidia in presence or absence of *Glomus intraradices* mycelium. In each experiment, values are means of 15 counts of 100 spores in each of the two Petri dishes by treatment. Each experiment is considered as a block in the ANOVA model. Percentages with a different letter are significantly different at  $P < 0.01$ .

Experiment	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>chrysanthemi</i> conidia				
	Concentration ( $\times 10^4$ )	Conidia germination			
		Control		<i>G. intraradices</i>	
		%	SD	%	SD
1	15	41.8	9.3	87.2	6.5
2	12	22.2	8.9	55.4	6.8
3	130	13.1	9.1	43.4	6.7
4	83	47.3	6.2	71.5	8.6
Pooled		31.2 a	16.5	64.7 b	18.2

**Table XVII.** Correlations between of *F. o. chrysanthemi* conidia germination percentage and *G. intraradices* hyphal or spore densities in each of the four experiments. Spearman rank correlation coefficient ( $R^2$ ) and probability of acceptance of the null hypothesis ( $P$ )

<i>G. intraradices</i>		Conidia germination percentages			
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4
Spore density	$R^2$	-0.271	0.155	-0.160	0.177
	$P$	0.147	0.450	0.397	0.351
Hyphal density	$R^2$	0.307	-0.041	-0.075	0.147
	$P$	0.098	0.844	0.695	0.439

**Table XVIII.** Radial growth of *F. o. chrysanthemi* colonies in presence or absence of *G. intraradices* mycelium. Values are means of three measurements on each of two colonies per treatment per block with three blocks per repetition and 4 (1, 2, 3, 4 days after inoculation) or 6 repetitions of the experiment (5 days after inoculation). Within the same row, values with a different letter are significantly different at  $P < 0.05$  by analysis of variance.

Days after inoculation	<i>F. o. chrysanthemi</i> mycelium length (mm)			
	Control		<i>G. intraradices</i>	
	Growth	SD	Growth	SD
1	2.685 a	0.948	3.475 b	1.106
2	6.003 a	1.422	7.109 b	1.422
3	10.268 a	2.054	11.848 b	1.422
4	14.523 a	3.160	16.271 b	2.054
5	19.746 a	4.107	21.326 b	3.159



**Table XIX.** Relationships between *F. o. chrysanthemi* growth (colony radius and concentration of newly-formed conidia) and *G. intraradices* mycelium (hyphal and spore densities). Spearman rank correlation coefficient ( $R^2$ ) and probability of acceptance of the null hypothesis:  $R^2=0$  ( $P$ )

<i>G. intraradices</i>		<i>F. o. chrysanthemi</i> colony radius					Conidia concentration
		Day-1	Day-2	Day-3	Day-4	Day-5	
Spore density	$R^2$	0.212	0.200	0.093	0.029	0.000	-0.278
	$P$	0.074	0.317	0.437	0.811	0.998	<0.001
Hyphal density	$R^2$	0.006	-0.039	0.224	0.305	0.039	-0.231
	$P$	0.960	0.744	0.059	0.009	0.688	0.002

## Discussion

The rhizosphere is a very thin soil zone influenced by roots (Curl and Truelove 1986). The microbial activity in this area is influenced by different organic substances released by the roots, such as soluble sugars, antibiotics, organic acids and volatile compounds (Hale et al. 1978) making up root exudates or secretions, plant mucilages, mucigels and cell lysates (Azcón-Aguilar and Barea 1992; Linderman 1988). Furthermore, rhizosphere microorganisms also excrete biologically active substances which may have a direct or indirect effect on microbial population equilibrium as well as on plant physiology. Thus, in order to isolate the impact of VAM fungi on a given soil organism, external influences such as those of roots or other soil microorganisms must be excluded.

The direct stimulation or inhibition of microbial activity by VAM fungi has been postulated often in recent years (Caron et al. 1985; Garcia-Garrido and Ocampo 1988b; Linderman 1988; Linderman and Paulitz 1990) but has never been supported by experimental evidence, mainly because of the lack of an adequate experimental system. For example, McAllister et al. (1994) studied the *in vitro* interaction between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*, but did not observe any effect of the VAM fungus on the two other microorganisms. In their experimental system, *G. mosseae* was represented only by germinating spores. It is possible that a larger VAM fungal biomass would have influenced *T. koningii* and *F. solani*, or that connection with a root would have conferred competence on the VAM fungal mycelium. Vancura et al. (1989) reported that the bacteria isolated from the hyphosphere of *G. fasciculatum* in symbiosis with three different plant species in unspecified growth conditions were all gram-negative, while a large amount of gram-positive bacteria are normally found in the rhizosphere of such plants. They suggested that these bacteria were selected from rhizosphere bacteria by their requirements for amino acids produced by the VAM mycelium.

In the present report, *F. o. chrysanthemi* conidial germination was strongly enhanced after 5 h incubation with an active *G. intraradices* mycelium. *F. o. chrysanthemi* hyphal growth was also significantly stimulated although overall conidia production by the pathogen was not affected in dixerenic culture with the VAM fungus. This is the first report of a clear, direct effect of a pure culture of VAM fungus on another microorganism.

Qualitative and quantitative changes have often been reported in the population of non pathogenic rhizosphere microorganisms of VAM plants grown in unsterile conditions. For example, larger populations of bacteria and actinomycetes were observed in the rhizosphere of VAM tomato plants (Bagyaraj and Menge 1978), while decreased bacterial biomass was reported from the rhizosphere of VAM cucumber (Christensen and Jakobsen 1993). Ames et al. (1984) measured significant increases and decreases in the number of specific bacteria in the rhizosphere of a pot-grown member of the Gramineae, while the size of the overall bacterial population was not modified. Meyer and Linderman (1986b) observed a significant increase in the total number of bacteria and actinomycetes of the rhizoplane but no significant change in the rhizosphere of VAM corn and clover. They also reported specific changes in the populations of certain bacterial functional groups, indicating an alteration of the microbial equilibrium. Similarly, Secilia and Bagyaraj (1987) reported higher or lower bacterial and actinomycete populations in the soil of pot-grown VAM grass compared to nonVAM controls, and observed shifts in morphological and physiological groups of bacteria associated with different species of VAM fungi used as inocula. Catska (1994) also observed an inhibition of phytotoxic micromycete populations and a stimulation of diazotroph bacteria in the rhizosphere of VAM apple-tree seedlings.

The mechanisms by which these changes occurred were not elucidated. The authors of these studies postulated that the modification in plant-derived organic factors in the soil induced by VAM colonization were responsible for the increase (Bagyaraj and Menge 1978) or the decrease (Ames et al. 1984; Christensen and Jakobsen 1993) of bacterial populations or for shifts in the relative importance of specific species. Our

results support the hypothesis that a direct interaction between the hyphal network of VAM fungi and rhizosphere microorganism accounts, at least in part, for the observed modifications in the microbial equilibrium, and we think that VAM fungal excretions could be involved.

Hyphal production of biologically active substances are known to occur with ectomycorrhizal fungi (Marx 1972; Strzelczyk and Pokojaska-Burdziej 1984), and physical association between soil microorganisms and ectomycorrhizal as well as VAM fungal structures has previously been reported (Clough and Sutton 1978; Malajczuk 1979; Orozco et al. 1984; Paula et al. 1993; Tisdall and Oades 1979; Vancura et al. 1989). Linderman and Paulitz (1990) have postulated that some microbes have a particular attraction for VAM fungi and live around the fungal hyphae. This implies that volatile or non-volatile substances are excreted or released by VAM fungal hyphae and are used by other microorganisms as nutrients.

In our study, *G. intraradices* increased spore germination and, to a lesser extent, the growth of *F. o. chrysanthemi*. Significant negative correlations were also found between *F. o. chrysanthemi* conidia production and VAM fungus hyphal or spore concentration. Substances such as polysaccharides (Clough and Sutton 1978) and amino acids (Vancura et al. 1989), for example, are good sources of carbon or nitrogen, which could be released by the VAM mycelium and could stimulate germination of *Fusarium* spores (Griffin 1981). The often observed lack of correlation between the density of hyphae or spores of *G. intraradices* and germination or growth of *F. o. chrysanthemi* despite the overall significant effect, is probably due to a too narrow range of VAM structure density on the experimental Petri plates. No efforts were made in this experiment to have VAM fungal hyphae and spore concentrations regularly spaced and ranging from low to high values, a condition essential to the isolation of stimulating or inhibiting effects from biological and experimental variability. In terms of the hypothesis of a substance released by the VAM fungus, a progressive release in conjunction with an abrupt response of *F. o. chrysanthemi* would also explain the observed lack of correlation. Abrupt changes in the response by one variable to continuous change of another variable

have been reported in biology, including fungal growth and differentiation (reviewed by Deakin 1990).

Even though the results presented here were obtained in completely artificial conditions, they show that VAM fungi have the potential to directly influence other soil microorganisms. This may be of interest in rhizosphere biology. Propagules of soilborne plant pathogens remain resting in the soil either because of inherent dormancy or because of fungistasis, a widespread natural soil toxicity manifested as nonspecific inhibition of propagule germination (Lockwood 1977). A stimulation of pathogenic propagules close to the mycorrhizal mycelium but far from roots, such as we observed *in vitro*, might reduce soil inoculum through exhaustion or lysis of the germination hyphae. This often-observed phenomenon of germination lysis (Papavizas and Lumsden 1980) or *suicide germination* has never been proposed to explain the harmful effect of mycorrhizal fungi on pathogen populations. A mycorrhizae-induced stimulation, or a preferential selection of rhizosphere inhabitants such as hyphosphere bacteria (Vancura et al. 1989) with potentially antagonistic or parasitic properties, could further repress soil-borne pathogens. Soil antagonism is a major factor regulating the potential inoculum level of *Trichoderma* in the soil (Papavizas 1985) and could also be involved in the regulation of populations of other biocontrol microorganisms. Our results also demonstrate that antibiosis, a mechanism involved in the ectomycorrhizal fungi - pathogen interaction (Sylvia and Sinclair 1981; Tsantrizos et al. 1991), and sometimes postulated to explain the protective effect of VAM fungi (Caron et al. 1986c), was not observed in the interaction between *G. intraradices* and *F. o. chrysanthemi* under these experimental conditions.

In conclusion, *G. intraradices* did not influence the overall *F. o. chrysanthemi* mycelium sporulation. However, in dual *in vitro* culture, in conditions that excluded the influence of any root or other soil microbe, the VAM mycelium strongly stimulated the pathogen conidial germination and slightly promoted hyphal growth.

## **Acknowledgement**

We wish to thank L. Dumont for excellent technical work, S. Daigle for good advise on experimental design and statistical analysis and P. Moutoglis for the revision of the linguistic content of the paper. This research was supported by an NSERC operating grant to J. André Fortin.

## Literature cited

- Ames, R.N., Reid, C.P.P., and Ingham, E.R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 96: 555-563.
- Azcón, R. 1987. Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol. Biochem.* 19: 417-419.
- Azcón, R. 1989. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 21: 639-644.
- Azcón-Aguilar, C., and Barea, J.M. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms *In Mycorrhizal Functioning. Edited by* M.F. Allen. Chapman & Hall, London. pp. 163-198.
- Azcón-Aguilar, C., Diaz-Rodriguez, R., and Barea, J.-M. 1986. Effects of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86: 337-340.
- Bagyaraj, D.J., and Menge, J.A. 1978. Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora. *New Phytol.* 80: 567-573.
- Baltruschat, H., and Schönbeck, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathol. Z.* 84: 172-188.
- Bécard, G., and Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Benhamou, N., Fortin, J.A., Hamel, C., St-Arnaud, M., and Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84: 958-968.
- Calvet, C., Barea, J.M., and Pera, J. 1992. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* 24: 775-780.

- Caron, M. 1989. Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 177-179.
- Caron, M., Fortin, J.A., and Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. *Plant Soil* 87: 233-239.
- Caron, M., Fortin, J.A., and Richard, C. 1986. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.
- Catska, V. 1994. Interrelationships between vesicular-arbuscular mycorrhiza and rhizosphere microflora in apple replant disease. *Biol. Plant.* 36: 99-104.
- Christensen, H., and Jakobsen, I. 1993. Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L). *Biol. Fert. Soils* 15: 253-258.
- Clough, K.S., and Sutton, J.C. 1978. Direct observations of fungal aggregates in sand dune soil. *Can J Microbiol* 24: 333-335.
- Codignola, A., Verotta, L., Spanu, P., Maffei, M., Scannerini, S., and Bonfante-Fasolo, P. 1989. Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *New Phytol.* 112: 221-228.
- Curl, E.A., and Truelove, B. 1986. The rhizosphere. *Advanced series in agriculture sciences*, Vol. 15, Springer-Verlag. New York.
- Deakin, M.A.B. 1990. Catastrophe modelling in the biological sciences. *Acta Biotheor.* 38: 3-22.
- Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Dehne, H.-W., and Schönbeck, F. 1979. Untersuchungen zum einfluß der endotrophen mycorrhiza auf pflanzenkrankheiten II. Phenolstoffwechsel und lignifizierung. *Phytopathol. Z.* 95: 210-216.



- Dehne, H.-W., Schönbeck, F., and Baltruschat, H. 1978. Untersuchungen zum einfluß der endotrophen mykorrhiza auf pflanzenkrankheiten 3. Chitinase-aktivitat und ornithinzyklus. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 85: 666-678.
- Draper, N.R., and Smith, H. 1981. Applied regression analysis. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V., and Gianinazzi, S. 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. Agric. Ecosyst. Environ. 29: 111-114.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S., and Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles *In* Endocytobiology. Edited by P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Grenier, L. Margulis, and D.C. Smith. INRA Press, Paris. pp. 153-157.
- Garcia-Garrido, J.M., and Ocampo, J.A. 1988. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. New Phytol. 110: 551-555.
- Garcia-Garrido, J.M., and Ocampo, J.A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. Soil Biol. Biochem. 21: 165-167.
- Gianinazzi-Pearson, V., Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F., Gianinazzi, S., and Dumas, E. 1992. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. Endocytobiosis Cell Res. 8: 177-185.
- Graham, J.H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. Hortscience 21: 1302-1306.
- Grandmaison, J., Olah, G.M., Van Calsteren, M.-R., and Furlan, V. 1993. Characterisation and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. Mycorrhiza 3: 155-164.

- Griffin, G. 1981. Physiology of conidium and chlamyospore germination in *Fusarium* In *Fusarium: diseases, biology, and taxonomy*. Edited by P. Nelson, T. Toussoum, and R. Cook. The Pennsylvania St. Univ. Press, University Park, London. pp. 331-339.
- Hale, M.G., Moore, L.D., and Griffin, G.J. 1978. Root exudates and exudation In *Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants*. Edited by Y.R. Dommergues, and S.V. Krupa. Elsevier Scientific Pub. Co., New York. pp. 103-203.
- Harrison, M.J., and Dixon, R.A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643-654.
- Krishna, K.R., and Bagyaraj, D.J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Can. J. Bot.* 61: 2349-2351.
- Krishna, K.R., Balakrishna, A.N., and Bagyaraj, D.J. 1982. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeous* and their effects in finger millet. *New Phytol.* 92: 401-405.
- Lehmann, E. 1975. *Nonparametrics - Statistical Methods Based on Ranks*. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, CA.
- Lieberer, R., and Feldmann, F. 1989. Physiological changes in roots colonized by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi - reactions in mutualistic and parasitic interactions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 251-255.
- Linderman, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions In *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Edited by G.J. Bethlenfalvay, and R.G. Linderman. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. pp. 45-70.
- Linderman, R.G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol In *Mycorrhizae and plant health*. Edited by F.L. Pfleger, and R.G. Linderman. APS Press, St. Paul. pp. 1-25.

- Linderman, R.G., and Paulitz, T.C. 1990. Mycorrhizal-rhizobacterial interactions *In* Biological control of soil-born Plant Pathogens. *Edited by* D. Hornby, R.J. Cook, Y. Henis, W.H. Ko, A.D. Rovira, B. Schippers, and P.R. Scott. CAB International, Wallingford, UK. pp. 261-283.
- Lockwood, J.L. 1977. Fungistasis in soils. *Biol Rev* 52: 1-43.
- Malajczuk, N. 1979. The microflora of unsterilized roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm. seedlings grown in soils suppressive and conducive to *Phytophthora cinnamomi* Rands. II Mycorrhizal roots and associated microflora. *Aust. J. Bot.* 27: 255-272.
- Marx, D. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454.
- Mayo, K., Davis, R., and Motta, J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431.
- McAllister, C.B., Garcia Romera, I., Godeas, A., and Ocampo, J.A. 1994. *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1369-1374.
- Meyer, J.R., and Linderman, R.G. 1986a. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* 18: 185-190.
- Meyer, J.R., and Linderman, R.G. 1986b. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 191-196.
- Morandi, D., Bailey, J.A., and Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 357-364.
- Mugnier, J., and Mosse, B. 1987. Spore germination and viability of a vesicular-arbuscular fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 411-413.

- Nirenberg, H.I. 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. *Can. J. Bot.* 59: 1599-1609.
- Oliveira, E., Sieverding, E., and Toro, S. 1987. Interaction between three species of VAM fungi and one isolate of *Pseudomonas putida* on cassava *In Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. Edited by D.M. Sylvia, L.L. Hung, and J.H. Graham.* Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, Fla. p. 216.
- Orozco, M.O., Fernandez, E., Prikryl, Z., Vancura, V., and Herrera, R.A. 1984. Observacionez del micelio extramatricio de las micorrizas vesiculo-arbusculares al microscopio electronico de barrido. *Acta Botanica Cubana* 20: 88-92.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- Papavizas, G.C., and Lumsden, R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389-413.
- Paula, M., Siquira, J., and Doñbereiner, J. 1993. Ocorrência de fungos micorrizicos vesiculoarbusculares e de bactérias diazotroficas na cultura da batata-doce. *Rev. Bras. Ci. Solo, Campinas* 17: 349-356.
- Paulitz, T.C., and Linderman, R.G. 1989. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 113: 37-45.
- Perrin, R. 1990. Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soil-borne fungi. *Soil Use Manage.* 6: 189-195.
- SAS Institute Inc. 1992. *The SAS System for Windows 3.10, release 6.08.* SAS Institute Inc.: Cary, NC.
- Schönbeck, F. 1979. Endomycorrhiza in relation to plant diseases *In Soil-Borne Plant Pathogens. Edited by B. Schippers, and W. Gams.* Academic Press, London New York San Francisco. pp. 271-280.

- Secilia, J., and Bagyaraj, D.J. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can. J. Microbiol.* 33: 1069-1073.
- Secilia, J., and Bagyaraj, D.J. 1988. Fungi associated with pot cultures of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90: 117-119.
- Spanu, P., and Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxydase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119-124.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., and Fortin, J.A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 187-194.
- Strzelczyk, E., and Pokojaska-Burdziej, A. 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.) in dixenic cultures with bacteria in media of different composition. *Plant Soil* 81: 185-194.
- Sylvia, D.M., and Sinclair, W.A. 1981. A proposed role for low level antibiotic activity of an ectomycorrhizal fungus. *Phytopathology* 71: 260.
- Tisdall, J., and Oades, J. 1979. Stabilization of soil aggregates by the root systems of rygrass. *Aust. J. Soil Res.* 17: 429-441.
- Tsantrizos, Y.S., Kope, H.H., Fortin, J.A., and Ogilvie, K.K. 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30: 1113-1118.
- Vancura, V., Orozco, M.O., Grauova, O., and Prikry, Z. 1989. Properties of bacteria in the hyphosphere of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 421-427.
- Wyss, P., Boller, T., and Wiemken, A. 1989. Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 451-456.

## *Chapitre 6*

### ***Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the nonVAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*<sup>5</sup>***

Dans ce chapitre, nous étudions l'effet du champignon EVA sur le développement d'une maladie chez une plante non mycorrhizienne. La séquence d'inoculation permet de mettre l'emphase sur les mécanismes reliés à une interaction microbienne directe ou indirecte dans le sol entre le champignon EVA et le parasite.

---

<sup>5</sup> Ces résultats ont fait l'objet d'une communication à un congrès international et ont été publiés sous forme d'article:

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J.A. 1996a. Co-culture with mycorrhizal *Tagetes patula* inhibited *Fusarium* wilt in the non-mycorrhizal host *Dianthus caryophyllus* as well as the pathogen in the soil *Dans Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae*, Berkeley, CA. Édité par T.M. Szaro et T.D. Bruns. pp. 112.

St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the nonVAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* **75**: 998-1005.

## Résumé

L'effet du champignon mycorhizien *Glomus intraradices* sur le développement de la maladie causée par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* chez l'espèce non mycorhizienne *Dianthus caryophyllus* a été étudié par culture conjointe des oeillets avec l'espèce mycorhizienne *Tagetes patula*. La présence des *T. patula* mycorhiziens a plus que doublé la survie des *D. caryophyllus*, a diminué significativement les symptômes de maladie et a réduit de 4:1 les propagules du *F. o. dianthi* dans le sol. Les plants non mycorhiziens du *T. patula* n'ont eu aucun effet. La biomasse des tiges du *D. caryophyllus* a été réduite par le *F. o. dianthi* dans les pots témoins, mais n'a pas été affectée par le parasite en présence du *G. intraradices*. En l'absence du parasite, l'inoculation du *G. intraradices* n'a pas eu d'effet sur la biomasse des deux espèces. Le contenu en éléments minéraux des tiges du *D. caryophyllus* n'a pas été influencé par le *G. intraradices*. En l'absence du *T. patula*, le *G. intraradices* n'a pas colonisé les racines du *D. caryophyllus*, alors qu'en sa présence, 14-20 % des racines de l'oeillet contenaient un grand nombre de vésicules et d'hyphes, mais très peu d'arbuscules. La présence du *G. intraradices* a clairement réduit la maladie causée par le *F. o. dianthi* chez le *D. caryophyllus*. La réduction de maladie est associée à une diminution du nombre de propagules du parasite dans le substrat et n'est pas liée à la nutrition des plantes. Nos résultats peuvent s'expliquer par l'induction des mécanismes de résistance du *D. caryophyllus* par le champignon mycorhizien ou par une interaction microbienne directe ou indirecte dans le sol.

**Mots clés:** mycorhize à vésicules et arbuscules, tagète, oeillet, maladie, lutte biologique

## Summary

The effect of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease development caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-mycorrhizal species *Dianthus caryophyllus* was studied by co-culture of carnation plants with the mycorrhizal species *Tagetes patula*. Presence of VAM on *T. patula* plants more than doubled the survival of *D. caryophyllus*, significantly reduced the disease symptoms, and decreased by 4:1 *F. o. dianthi* propagules in soil. Non-VAM *T. patula* plants had no effect on disease. *D. caryophyllus* shoot biomass was reduced by *F. o. dianthi* in non-VAM controls but was not affected in presence of *G. intraradices*. *G. intraradices* alone had no effect on *T. patula* or *D. caryophyllus* shoot biomass. *D. caryophyllus* mineral shoot content was not modified by *G. intraradices*. In the absence of *T. patula*, *G. intraradices* did not colonize *D. caryophyllus*, while in the presence of *T. patula*, 14-20 % of carnation root length contained abundant vesicles and hypha but rarely arbuscules. The presence of *G. intraradices* clearly reduced the disease caused by *F. o. dianthi* in *D. caryophyllus*. Reduction in disease severity was associated with reduced *F. o. dianthi* propagule number in the substrate and clearly was unrelated to plant nutrition. Our results could be explained either by induction of the *D. caryophyllus* disease resistance mechanisms by the mycorrhizal fungus or by direct or indirect microbial interactions in soil.

**Key words:** vesicular-arbuscular mycorrhizae, marigolds, carnation, disease, biocontrol



## Introduction

Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi have coevolved in an intimate relationship with vascular plants for 400 million years (Remy et al. 1994; Simon et al. 1993; Taylor et al. 1995). These fungi are physiologically and ecologically important for most vascular plants in different ways. Besides the well known benefit of increasing the nutrient availability to their host plant (Smith and Gianinazzi-Pearson 1988), they can reduce plant root disease symptoms and pathogen populations in soil through mechanisms that are not fully understood (Dehne 1982; St-Arnaud et al. 1995a). Furthermore, it has been suggested that in species which generally do not gain any nutritive advantage from VAM colonization, protection against pathogenic attack conferred by VAM fungi might be the main benefit of this symbiotic association to plants (Newsham et al. 1995).

Improvement of plant nutrition, stimulation of host plant disease resistance mechanisms, direct interactions with pathogens, or indirect effects through changes in soil microflora are mechanisms proposed to explain the interaction of VAM fungi with disease development (St-Arnaud et al. 1995a). It has been demonstrated that pathogen inhibition by VAM colonization could not always be explained by increased phosphorus nutrition of mycorrhizal plants, nor by the extent of VAM colonization in the roots (Caron et al. 1986c; St-Arnaud et al. 1994b). Plant gene products associated with resistance responses following VAM colonization have been the subject of contradictory studies over the years, but evidence for their implication in the increased disease resistance of VAM plants was recently published (Benhamou et al. 1994; Volpin et al. 1994, 1995). Shifts in the presence or abundance of microbial species were reported in the rhizosphere of mycorrhizal plants, and other significant parameters, such as the spatial distribution of these organisms, might also be strongly influenced by mycorrhizal fungi (Linderman and Paulitz 1990). Many studies have demonstrated that the interaction between VAM fungi and other rhizosphere inhabitants could be detrimental to the VAM fungi (Krishna et al. 1982), to certain rhizosphere microorganisms (Paulitz and Linderman 1989; Posta et al. 1994), and to pathogens (Meyer and Linderman 1986b;

Secilia and Bagyaraj 1987) or, in contrast, could be favorable to other rhizosphere microorganisms (Posta et al. 1994), to VAM fungi and to their host plants (Calvet et al. 1992; Meyer and Linderman 1986a).

In order to study the effect of interaction in soil between a VAM fungus and soil microorganisms on plant disease control, we designed a companion plant system composed of a VAM species (*Tagetes patula* L., *Compositae*) and a non-mycorrhizal species (*Dianthus caryophyllus* L., *Caryophyllaceae*). To our knowledge, the effect of a VAM fungus on disease development in a non-VAM host has never been studied. The purpose of this research was therefore to test the effect of the presence of *Glomus intraradices* Schenck & Smith mycelium on the disease caused by *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *dianthi* (Prill. & Del.) Snyder & Hansen in *D. caryophyllus*.

## Materials and methods

### EFFECT OF HOST /NON-HOST PLANTS CO-CULTURE ON VAM COLONIZATION

The experimental design was a split plot in three blocks, with plant species grouping treatments randomized among the main plots and *G. intraradices* inoculation treatments randomized among the subplots. There were two similar pots within subplots. Seeds of the VAM species *T. patula* cv Aurora and the nonVAM species *D. caryophyllus* cv Enfant de Nice were surface sterilized for 5 min in 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rinsed with sterile distilled water. A group of three seeds of *T. patula* only (T<sup>+</sup>D<sup>-</sup>), of *D. caryophyllus* only (T<sup>-</sup>D<sup>+</sup>) or two groups of both species (T<sup>+</sup>D<sup>+</sup>) were sown in 18 cm plastic pots containing 1.2 L of autoclaved (2 h, 121°C) calcined montmorillonite clay (Turface, IMC Imcore, Mundelein, IL, USA). The substrate was previously saturated with distilled water. In the treatment involving the two species, 8 cm spacing was left between the plants.

The VAM inoculum consisted of the growth substrate (calcined montmorillonite clay) and roots of pot-grown *Zea mays* L. colonized to 75 % of the root length by *G. intraradices* (DAOM 181602). One hundred mL of inoculum was evenly spread in a layer in each pot and placed at 1 cm under the seeds. Controls received autoclaved (1 hr, 121°C) VAM *Z. mays* growth substrate. This material had been previously washed for 3 hrs in sterile distilled water and the washing filtered through a 2.7 µm glass microfiber filter (Whatman GF/D). One hundred mL of the washing was spread on the autoclaved calcined clay in an attempt to introduce the bacteria associated with the mycorrhizal corn roots used as inoculum, but without *G. intraradices*.

Fifteen days after sowing, the plantlets were thinned out to one plant per seed lot, i.e. one or two plants per pot depending on the sowing treatment. The plants were maintained in a growth cabinet, watered as needed with distilled water and fertilized with 40 mL·wk<sup>-1</sup> of Long Ashton nutrient solution (Hewitt 1966) from week-3 to week-11 and then with 60 mL·wk<sup>-1</sup> to the end of experiment. Fluorescent lamps were operated

16 hrs·day<sup>-1</sup> at a photon flux of 450 microEinsteins·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> (PAR). Relative humidity was 60-70 % and temperatures were 22°C (day) and 15°C (night).

The plants were harvested 119 days after sowing. Shoot dry mass of each plant and total root dry mass for each pot was determined after drying at 70°C for 3-6 days. The roots of each species were cut in 1-cm sections, thoroughly mixed, and after staining a subsample with acid fuchsin (Kormanik and McGraw 1982), the percentage of root length colonized by *G. intraradices* was determined using the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980). In the pots containing both plant species, only the roots attached to each plant after depotting and removal of the substrate were used for estimating root colonization, in order to minimize misidentification of the roots.

Statistical analyses were done with General Linear Model procedures of SAS software (SAS Institute Inc. 1992). The effect of treatments on shoot and root dry weights and on root colonization by the VAM fungus were analysed by an ANOVA.

#### **EFFECT OF CO-CULTURE WITH A VAM PLANT ON FUSARIUM WILT OF A NONVAM PLANT**

The experimental design was a split plot in four blocks, with the *G. intraradices* inoculation treatments randomized among the main plots and the *F. o. dianthi* treatments randomized among the subplots. Treatments were *G. intraradices* only (G<sup>+</sup>F<sup>-</sup>), *F. o. dianthi* only (G<sup>-</sup>F<sup>+</sup>), *G. intraradices* and *F. o. dianthi* (G<sup>+</sup>F<sup>+</sup>), and the control (G<sup>-</sup>F<sup>-</sup>). There were three pots each containing three *D. caryophyllus* plants within each subplot.

Seeds of *T. patula* 'Aurora' were surface sterilized for 5 min in 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rinsed with sterile distilled water. Two groups of three seeds were sown per 30 cm plastic pot which contained 10 L of calcined montmorillonite clay. The substrate had been saturated with 3 L of Long Ashton nutrient solution per pot before seeding. Two grams of fresh roots of pot-grown *Z. mays* colonized to 50 % of the root length by *G. intraradices* were cut into 1 cm segments and were evenly spread in a layer, 1 cm under each group of seeds. Controls were prepared as described previously and 10 mL of the filtered VAM

root washings were spread over the autoclaved *Z. mays* roots. The *T. patula* plantlets were thinned to keep two plants per pot, each one at an opposite side of the pot, 10 days after sowing.

The mycorrhizal fungus was allowed to become establish in the soil of the designated pots for 35 days, before 100 mL of a spore suspension of *F. o. dianthi* race 2 (ATCC 64922) or sterile water was added in each pot. *F. o. dianthi* was grown on PDA, incubated at 25 °C in the dark for 21 days, and the conidia were harvested in sterile distilled water. The suspension contained  $1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  microconidia and macroconidia in a 35:1 ratio. Seven days later, seeds of *D. caryophyllus* 'Enfant de Nice' were surface sterilized for 5 min in 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ , rinsed with sterile distilled water, and sown in a row between the two *T. patula* plants in three groups of three seeds equally spaced from each other. The *D. caryophyllus* plantlets were thinned 19 days after sowing to keep three plants per pot.

The plants were grown in a greenhouse, watered as needed with distilled water and fertilized with  $100 \text{ mL} \cdot \text{wk}^{-1}$  of Long Ashton nutrient solution for the first ten weeks and then with  $150 \text{ mL} \cdot \text{wk}^{-1}$  to the end of the experiment. Diazinon and bendiocarb sprays were regularly applied to control whitefly and thrips infestations. Survival of the *D. caryophyllus* plants was evaluated weekly from emergence to harvest. The *T. patula* plants were cut at the base of the stem and the shoots were harvested 124 days after sowing. For the *D. caryophyllus* plants, the experimental blocks 1 to 4 were harvested weekly 132-154 days after sowing.

For each *D. caryophyllus* plant, the foliar symptoms were estimated on the following scale : 0, healthy plant; 1, some chlorosis ; 2, < 50 % wilted foliage ; 3, > 50 % wilt foliage ; and 4, 100 % wilted or dead plant. The *F. o. dianthi* population density in 15-g samples of substrate per pot was estimated on the Komada's selective medium (Komada 1975) using a dilution technique (Dhingra and Sinclair 1985). The colonies were counted after 7 days of incubation at 20-24°C under diffuse natural light. The water content of the substrate in each pot was determined after drying a sample at 100°C for 24 h. Shoot dry mass of each species were determined after drying at 70°C for 3-6 days. The percentage

of *D. caryophyllus* root length colonized by *G. intraradices* was determined as described previously. The N, P, K, Ca, Mg, B, Zn, Fe, Mn and Cu contents of *D. caryophyllus* leaves were analyzed for *F. o. dianthi*-uninoculated pots ( $G^-F^-$  and  $G^+F^-$  inoculation treatments) from a compound sample made by mixing the foliage of the three plants of each pot. N was analyzed by the Kjeldahl method (Bremner and Mulvaney 1982) with a Technicon® autoanalyzer. Other elements were analyzed by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP) following dry ashing (Plank 1992).

Statistical analyzes were done with General Linear Model procedures of SAS software (SAS Institute Inc. 1992) and Log Linear Analysis of STATGRAPHICS software (STSC Inc. 1988). The effect of inoculation treatments on foliar symptom classes was analyzed with Frequency tables analysis using a log linear model (Lehmann 1975). The following variables were analyzed using ANOVA: *T. patula* shoot dry weight, *D. caryophyllus* shoot mineral content, rank transformed shoot dry weight, arcsine of the percentages of *G. intraradices* colonized root length, and rank transformed *F. o. dianthi* colony forming units (cfu). Rank transformation (Lehmann 1975) and arcsine transformation (Draper and Smith 1981) of the data were used in order to meet the requirements of the tests. *A posteriori* comparisons between treatments were done by Tukey's studentized range tests.

## Results

### EFFECT OF HOST AND NON-HOST PLANTS CO-CULTURE ON VAM COLONIZATION

*Tagetes patula* shoot and root dry weights were not affected by *G. intraradices* inoculation but were significantly decreased by co-culture with *D. caryophyllus* (Table XX). No interaction was found between presence of *D. caryophyllus* plants and VAM inoculation treatments. Similarly, *D. caryophyllus* shoot and root dry weights were not affected by *G. intraradices* inoculation but were significantly decreased by the presence of *T. patula* plants. No interaction was found between presence of *T. patula* plants and VAM inoculation treatment.

As the G- control plants were free of mycorrhizal structures, data from G- controls ( $T^+D^-G^-$ ,  $T^+D^+G^-$ ,  $T^-D^+G^-$ ) were not included in the percentages of root length bearing *G. intraradices* arbuscules or vesicles analysis of variance. The percentage of *T. patula* root length bearing *G. intraradices* structures was not affected by co-culture with *D. caryophyllus* plants (Table XX). *D. caryophyllus* root colonization was undetectable when the plants were grown alone but was significantly increased to 33.7 % of root length in presence of *T. patula* plants. Arbuscules of *G. intraradices* were abundant in all the colonized root length of the VAM-inoculated *T. patula* plants, regardless of the presence of *D. caryophyllus* plants in the pot. In the VAM-inoculated *D. caryophyllus* plants co-cultured with *T. patula*, the root length colonized by *G. intraradices* contained abundant vesicles and hyphae but very few arbuscules, which were scarce and detected only in three of the six replicates.

**Table XX.** Effect of inoculation with the VAM fungus *Glomus intraradices* on plant dry weights and fungal root colonization of *Tagetes patula* and *Dianthus caryophyllus* growing in the same container, at harvest.

Treatment <sup>a</sup>	<i>T. patula</i>		<i>D. caryophyllus</i>		Root dry weight <sup>c</sup> (g)
	Shoot dry wt <sup>2</sup> (g)	VAM <sup>b</sup> (%)	Shoot dry wt (g)	VAM (%)	
T <sup>+</sup> D <sup>-</sup> G <sup>-</sup>	6.08 <i>b</i>	0.0	–	–	1.25 <i>a</i>
T <sup>+</sup> D <sup>-</sup> G <sup>+</sup>	6.28 <i>b</i>	56.7 <i>a</i>	–	–	1.47 <i>a</i>
T <sup>+</sup> D <sup>+</sup> G <sup>-</sup>	3.07 <i>a</i>	0.0	4.07 <i>a</i>	0.0	4.17 <i>b</i>
T <sup>+</sup> D <sup>+</sup> G <sup>+</sup>	3.53 <i>a</i>	58.5 <i>a</i>	3.90 <i>a</i>	33.7 <i>b</i>	3.75 <i>b</i>
T <sup>-</sup> D <sup>+</sup> G <sup>-</sup>	–	–	7.90 <i>b</i>	0.0	4.96 <i>c</i>
T <sup>-</sup> D <sup>+</sup> G <sup>+</sup>	–	–	7.90 <i>b</i>	0.0 <i>a</i>	5.14 <i>c</i>

**Note:** Within each column, means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Tukey's studentized range tests.

<sup>a</sup> Presence of *T. patula* (T<sup>+</sup>D<sup>-</sup>), *D. caryophyllus* (T<sup>-</sup>D<sup>+</sup>) or both (T<sup>+</sup>D<sup>+</sup>) in the pot, along with inoculation with *G. intraradices*(G<sup>+</sup>) or nonmycorrhizal control (G<sup>-</sup>).

<sup>b</sup> Percent root length bearing fungal structures of *G. intraradices*, as evaluated with the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980). Data from G<sup>+</sup> treatments only were included in the analysis of variance.

<sup>c</sup> Total root dry weight within each pot (*T. patula* or *D. caryophyllus* alone or combined depending on the sowing treatment).



## EFFECT OF CO-CULTURE WITH A VAM PLANT ON FUSARIUM WILT OF A NONVAM SPECIES

In the *F. o. dianthi*-inoculated pots, survival of the *D. caryophyllus* plants during the course of the experiment and foliar symptoms shown at harvest were modified by the mycorrhizal status of the *T. patula* companion plants. In pots which received the non-mycorrhizal *T. patula* plants, *D. caryophyllus* seedlings began to die 49 days after sowing, and only 10 out of the 36 initial plants were alive after 132 days (Figure 6). However, in presence of the mycorrhizal *T. patula* plants, even if some seedlings also began to die at the 49th day, 24 out of the 36 plants were alive after 132 days. At that time, in the non mycorrhizal treatment, significantly more *D. caryophyllus* plants showed symptoms classified as '100 % wilted or dead plant' and significantly less plants fell into the 'healthy plant' category as compared to the pots which received mycorrhizal *T. patula* (Table XXI). In the *F. o. dianthi*-uninoculated pots, presence of mycorrhizal *T. patula* plants did not influence *D. caryophyllus* survival nor symptoms and all plants belonged in the 'healthy plant' or 'some chlorosis' categories within similar proportions at the end of the experiment.

As all but two pots of the  $F^-$  control treatments were free of *F. o. dianthi* propagules at harvest, data from  $F^-$  controls ( $G^-F^-$ ,  $G^+F^-$ ) were not included in the *F. o. dianthi* propagules analysis of variance. The number of propagules of *F. o. dianthi* was four times lower in the growth substrate of *D. caryophyllus* plants grown with *G. intraradices*-inoculated *T. patula* as compared with those which were grown with non-mycorrhizal *T. patula* plants (Table XXII).

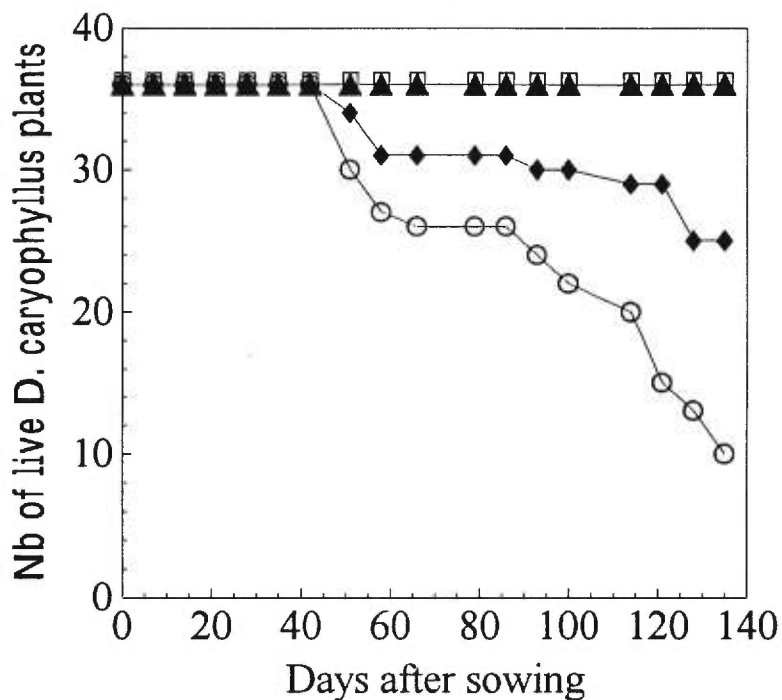
*D. caryophyllus* shoot dry mass was significantly reduced by *F. o. dianthi* inoculation in the pots which received non-mycorrhizal *T. patula* plants (Table XXIII). However, in the presence of VAM *T. patula* plants, *F. o. dianthi* did not significantly modify *D. caryophyllus* shoot dry mass which was similar to those of the uninoculated control or VAM *T. patula* only treatment. This led to a significant interaction between *F. o. dianthi* and *G. intraradices* inoculation treatments. There was no effect of

*G. intraradices* or *F. o. dianthi* on *T. patula* shoot dry mass, and no interaction was found between VAM and pathogen inoculations.

In the presence of mycorrhizal *T. patula* plants, *D. caryophyllus* roots were colonized by *G. intraradices* and bore VAM structures in 14.3 to 19.9 % of their root length (Table XXIII). Vesicles and hyphae of the VAM fungus were abundant in all the colonized roots. Few arbuscules were detected in five of the 24 VAM inoculated pots. The VAM colonization level was not affected by *F. o. dianthi* inoculation.

*D. caryophyllus* shoot N, P, K, Ca, Mg, B, Zn, Fe, Mn and Cu levels were not modified by co-culture with VAM *T. patula* companion plants (Table XXIV).

**Figure 6.** Effect of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* on the survival of *Dianthus caryophyllus* plants during a 132-days period, as affected by co-culture with mycorrhizal or non-mycorrhizal *Tagetes patula*. Inoculation treatments were control ( $G^-F^-$ ,  $\square$ ), *Glomus intraradices* only ( $G^+F^-$ ,  $\blacktriangle$ ), *G. intraradices* and *F. o. dianthi* ( $G^+F^+$ ,  $\blacklozenge$ ), and *F. o. dianthi* only ( $G^-F^+$ ,  $\circ$ ).



**Table XXI.** Effect of co-culture with mycorrhizal or non-mycorrhizal *Tagetes patula* on the percentage of *Dianthus caryophyllus* plants showing each class of symptoms caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, 132-days after sowing.

Scale <sup>a</sup>	Without <i>F. o. dianthi</i>		With <i>F. o. dianthi</i>	
	Without <i>G. intraradices</i>	With <i>G. intraradices</i>	Without <i>G. intraradices</i>	With <i>G. intraradices</i>
0	44.4	52.8	11.1 –	55.5 +
1	55.6	47.3	13.9	30.6
2	0.0	0.0	0.0	2.8
3	0.0	0.0	8.3	0.0
4	0.0	0.0	55.0 +	11.1 –
Overall	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>

**Note:** In each pot, *D. caryophyllus* plants were grown in co-culture with *T. patula* colonized with *G. intraradices* or non-inoculated (without *G. intraradices*), and were inoculated with *F. o. dianthi* or non inoculated with the pathogen (without *F. o. dianthi*). Within each *F. o. dianthi* inoculation treatment, columns with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) according to a frequency tables analysis using a log linear model. A symptom class with a percentage followed by a – or + sign was significantly under- or over-represented, respectively, by comparison with the same class of the opposite *G. intraradices* inoculation treatment.

<sup>a</sup> Symptoms were estimated on a scale where 0, healthy plant; 1, some chlorosis; 2, < 50 % wilted foliage; 3, > 50 % wilt foliage; and 4, 100 % wilted or dead plant.

**Table XXII.** Effect of co-culturing *Dianthus caryophyllus* with VAM or non-VAM *Tagetes patula* on the number of propagules of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* recovered in the growth substrate at harvest of the *D. caryophyllus* plants.

Inoculation treatment <sup>a</sup>	<i>F. o. dianthi</i> propagules (CFU · g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
G <sup>-</sup> F <sup>-</sup>	31.5
G <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	0.6
G <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	294.9 <i>a</i>
G <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	1192.1 <i>b</i>

<sup>a</sup> Control (G<sup>-</sup>F<sup>-</sup>), *G. intraradices* only (G<sup>+</sup>F<sup>-</sup>), *G. intraradices* and *F. o. dianthi* (G<sup>+</sup>F<sup>+</sup>), and *F. o. dianthi* only (G<sup>-</sup>F<sup>+</sup>).

<sup>b</sup> Means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by analysis of variance. Data from F<sup>+</sup> treatments only were included in the analysis of variance.

**Table XXIII.** Effect of co-culture of *Dianthus caryophyllus* plants with VAM or non-VAM *Tagetes patula* plants on shoot dry weights of both plants at harvest, and on root colonization of *D. caryophyllus* plants inoculated with the carnation wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*.

Inoculation treatment <sup>a</sup>	<i>T. patula</i>	<i>D. caryophyllus</i>	
	Shoot dry wt. (g)	Shoot dry wt. (g)	VAM (%) <sup>b</sup>
G <sup>-</sup> F <sup>-</sup>	6.0 <i>a</i>	5.1 <i>a</i>	1.8 <i>a</i>
G <sup>+</sup> F <sup>-</sup>	6.7 <i>a</i>	5.1 <i>a</i>	14.3 <i>b</i>
G <sup>+</sup> F <sup>+</sup>	6.2 <i>a</i>	3.9 <i>a</i>	19.9 <i>b</i>
G <sup>-</sup> F <sup>+</sup>	6.7 <i>a</i>	1.3 <i>b</i>	3.5 <i>a</i>

**Note:** *T. patula* plants were harvested 124 days after sowing; *D. caryophyllus* plants were harvested weekly 132 to 154 days after sowing for block 1 to 4. Within each column, means with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by Tukey's studentized range tests.

<sup>a</sup> Control (G<sup>-</sup>F<sup>-</sup>), *G. intraradices* only (G<sup>+</sup>F<sup>-</sup>), *G. intraradices* and *F. o. dianthi* (G<sup>+</sup>F<sup>+</sup>), and *F. o. dianthi* only (G<sup>-</sup>F<sup>+</sup>).

<sup>b</sup> Percent root length bearing fungal structures of *G. intraradices*, as evaluated with the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980).

**Table XXIV.** Shoot mineral content of *Dianthus caryophyllus* at harvest, as influenced by co-culture with VAM or non-VAM *Tagetes patula*.

	With <i>G. intraradices</i>	Without <i>G. intraradices</i>
Macronutrients (%)		
N	1.65 <i>a</i>	1.57 <i>a</i>
P	0.38 <i>a</i>	0.37 <i>a</i>
K	4.59 <i>a</i>	4.66 <i>a</i>
Ca	1.17 <i>a</i>	1.27 <i>a</i>
Mg	0.48 <i>a</i>	0.53 <i>a</i>
Micronutrients (ppm)		
B	47.8 <i>a</i>	52.6 <i>a</i>
Zn	28.4 <i>a</i>	30.9 <i>a</i>
Fe	112.5 <i>a</i>	108.3 <i>a</i>
Mn	98.7 <i>a</i>	112.5 <i>a</i>
Cu	2.5 <i>a</i>	2.9 <i>a</i>

**Note :** In each pot, *D. caryophyllus* was grown in co-culture with a *T. patula* plant colonized with *G. intraradices* or non-inoculated (without *G. intraradices*). The *D. caryophyllus* plants were harvested weekly from 132 to 154 days after sowing. Within each row, means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ) by analysis of variance.

## Discussion

The presence of an active mycelium of *G. intraradices* in the substrate prior to sowing of *D. caryophyllus* seeds clearly reduced the disease caused by *F. o. dianthi*. In pots inoculated with *F. o. dianthi* only, more than twice the *D. caryophyllus* plants died in comparison with the pots which received the two fungi. In mycorrhizae-inoculated pots, *D. caryophyllus* plants also had three-times greater biomass and far less disease symptoms than plants in the *F. o. dianthi*-only inoculated pots. Moreover, in the presence of the VAM fungus, *F. o. dianthi* propagules in the growth substrate were four times less abundant than in non-VAM controls. To our knowledge, this is the first report of disease reduction in a non-host plant species by a VAM fungus.

These results question the functionality of the VAM symbiosis in *D. caryophyllus* plants co-cultured with VAM *T. patula*, and the possibility that this interaction accounts for the reduction in disease through physiological exchanges between symbionts. *Caryophyllaceae* are considered to be a non-mycorrhizal family (Tester et al. 1987) even if typical structures of VAM fungi were occasionally reported in the roots of some species in natural stands. Our results confirmed that, when *D. caryophyllus* was grown alone, the VAM fungus failed to penetrate the roots, as previously reported (Giovannetti et al. 1994). However, the presence of mycotrophic plants near the roots of non-mycotrophic species have been shown to increase the penetration and internal colonization of non-hosts by VAM fungi (Koide and Schreiner 1992; Tester et al. 1987). Again, our results agreed, but the extent of *D. caryophyllus* root colonization observed here, and the abundance of vesicles and hyphae, even if significantly lower than that reached by *T. patula* roots growing nearby, were not expected since only very low and unpredictable levels of root colonization were previously reported in these conditions (Ocampo et al. 1980; Vierheilig et al. 1995; Vierheilig et al. 1994).

The mechanisms leading to the development of a functional symbiosis between a VAM fungus and a potential host plant remain to be elucidated. In an attempt to explain the colonization of non-host species when grown with VAM plants, Koide and



Schreiner (1992) postulated that the missing signal from the non-mycotrophic species might be supplied to the fungus by the roots of the nearby mycotrophic species, or that adjacent roots of mycotrophic species might provide the fungus with the energy necessary to infect the non-mycotroph. Our results do not support one hypothesis more than the other.

In this study, the most significant difference between *T. patula* and *D. caryophyllus* colonization patterns was the abundant formation of VAM arbuscules in the former species roots but the almost complete absence of these structures in the latter. *D. caryophyllus* had no effect on the colonization level measured in the adjacent *T. patula* roots. Even if the production of fungal inhibitors is a possible mechanism to inhibit VAM colonization in non-mycotrophic species (Koide and Schreiner 1992), *D. caryophyllus* apparently has no barriers to VAM fungal growth and vesicle formation. Most researchers define a VAM plant as one in which arbuscules are formed when the roots are penetrated by a VAM fungus (Tester et al. 1987). Functional compatibility is considered as a prerequisite to arbuscule development and to a reciprocal exchange of nutrients across the interface between the two partners (Koide and Schreiner 1992) and results from a recognition and subsequent modification in gene expression in both partners (Gianinazzi 1991). Gianinazzi-Pearson et al. (1991, 1995) postulated that the symbiosis is under control of multiple and specific symbiosis genes. The nearly complete lack of arbuscule production observed in this experiment for *D. caryophyllus* roots suggests that arbuscule formation obviously requires at least one distinct and additional step over the signals or mechanisms leading to *D. caryophyllus* intraradical hyphal growth, which were likely contributed by the adjacent *T. patula* roots. Successful symbiosis establishment is thought to involve structural, symbiotic and defence-related genes (Bonfante and Perotto 1995). *D. caryophyllus* might lack only one or a few of the loci or genes implicated in symbiosis establishment. As there were virtually no arbuscules formed and also no growth response or any effect on shoot mineral content of *D. caryophyllus* after months of growth with an established VAM mycelium, we suggest that the observed root colonization was not a functional symbiosis. This does not clearly rule out the possibility of disease symptoms or pathogen population reduction through

metabolic exchanges between symbionts, but the effect is clearly not nutritional. Much emphasis has been previously placed on the improved P assimilation of mycorrhizal plants to explain their resistance to disease development (Smith 1988). The present results strongly support the observations of Caron et al. (1986c) and St-Arnaud et al. (1994b) that better P nutrition of the mycorrhizal plants could not be the only explanation for the reduction of disease symptoms or pathogen populations of *F. o. radialis-lycopersici* on tomato plants, and of *Pythium ultimum* on marigolds. Here, the non-mycorrhizal species *D. caryophyllus* was protected against *F. o. dianthi* through mechanisms obviously not linked with symbiotically-mediated metabolic exchanges between the host plant and the VAM fungus. Our results, rather, lead to the possibility of two types of mechanisms: (i) induction of the *D. caryophyllus* disease resistance mechanisms by the mycorrhizal fungus or (ii) direct or indirect interaction between *G. intraradices* and *F. o. dianthi* inoculum in the substrate prior to sowing of *D. caryophyllus*.

Stimulation of plant disease resistance mechanisms has been repeatedly hypothesized to explain the decrease of disease in VAM plants (Caron et al. 1986d; Gianinazzi 1991; Morandi et al. 1984; Rosendahl 1985). In the recent years, some lines of evidence have supported this hypothesis. It has been shown that VAM fungal colonization may induce a slight and transient activation of metabolic pathways related to disease resistance mechanisms (Harrison and Dixon 1993; Lambais and Mehdy 1993, 1995; Spanu et al. 1989; Spanu and Bonfante-Fasolo 1988; Volpin et al. 1994). Recently, a strong stimulation of disease resistance mechanisms in mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots was reported when the roots were challenged with a pathogen seven days after VAM inoculation (Benhamou et al. 1994). Restriction of pathogen growth to the root epidermis and outer cortex, contrasting markedly with the extensive growth in the root tissues and degradation of the plant cells in non-VAM roots, and the absence of visible changes in the carrot roots inoculated with the VAM fungus alone were described. However, in our experiment, *D. caryophyllus* seedlings were not submitted to a prior sensitization, but rather were exposed to the pathogen and the VAM fungus simultaneously. Actually, it is assumed that systemic acquired resistance development in uninfected tissues requires a minimum lag period of a few days to a few weeks following

the elicitation, and before challenging with the pathogen for the expression of resistance (Bonnet et al. 1996; Kuć 1982, 1987; Leeman et al. 1995). For example, van Peer et al. (1991) reported that inoculation of *D. caryophyllus* cuttings with *Pseudomonas* sp. significantly reduced disease symptoms caused by *F. o. dianthi* through induced systemic resistance when inoculation of the bacteria was done one week before pathogen inoculation, but not when the two microorganisms were co-inoculated. Moreover, the accumulation of defense related transcripts in root cells following VAM colonization was shown to occur only in the cells containing arbuscules (Blee and Anderson 1996; Harrison and Dixon 1994) and a similar accumulation was not detected near hyphae or vesicles which were virtually the only VAM structures observed in *D. caryophyllus* roots in this experiment. It is therefore unlikely that activation of disease resistance mechanisms during VAM colonization significantly contributed to the observed reduction of the disease caused by *F. o. dianthi* in *D. caryophyllus* in our experimental conditions.

As the VAM fungus mycelium was already established in the substrate at the time of inoculation of *F. o. dianthi*, an interaction between the two fungi which had taken place during the time preceding the sowing of the *D. caryophyllus* seeds may explain the lowering of disease. Direct stimulation of *F. o. chrysanthemi* conidial germination and hyphal growth by a VAM fungus mycelium was recently demonstrated (St-Arnaud et al. 1995b). In this experiment, if *F. o. dianthi* conidia were similarly stimulated by the *G. intraradices* mycelium after pathogen inoculation, i.e. one week before the *D. caryophyllus* sowing, it might have reduce *F. o. dianthi* inoculum density through exhaustion of the germination hyphae. Direct stimulation of other specific microorganisms by *G. intraradices* is also possible and may have produced antagonism to *F. o. dianthi* conidial germination and hyphal growth. Population dynamics of the plant root microflora is influenced by mycorrhizal fungi, not only near the host roots but also around the extramatrical mycelium of the mycorrhizal fungi (Linderman 1988; Linderman and Paulitz 1990). Recently, the VAM symbiosis has been shown to increase the proportion of microbial population retrieved from bulk soil as compared to rhizosphere soil (Posta et al. 1994; Ravnskov et al. 1996), which suggests that carbon of plant origin is brought into the bulk soil by the VAM hyphae. Attachment of soil bacteria to the

spores and mycelium of a VAM fungus has also been described and supports the hypothesis of mediation of microbial populations by the VAM extramatrical mycelia (Bianciotto et al. 1996). We therefore postulate that a modification of the mycorrhizosphere microbial equilibrium through a direct interaction between the hyphal network of VAM fungi and soil microorganisms, before *D. caryophyllus* sowing, is a strong possibility to explain the disease and pathogen population reductions observed in this experiment.

A difference in the physiological activity of the *T. patula* roots, mediated by the VAM symbiosis, might have also influenced soil microbial population and created an environment antagonistic to *F. o. dianthi*, resulting in decreased disease severity. Although, it is not possible to choose between the different hypotheses proposed, our results, in the light of previous studies on the effect of VAM fungi on disease resistance, point out the importance of direct and indirect interactions of VAM fungi with pathogens, even if other mechanisms such as stimulation of disease resistance mechanisms may also be involved.

In conclusion, we demonstrated for the first time that the presence of VAM fungi can reduce disease development in a non-VAM species. The presence of *G. intraradices* clearly reduced symptoms caused by *F. o. dianthi*, seedling mortality and growth reduction in the non-VAM species *D. caryophyllus*. Reduction in disease severity was associated with reduced *F. o. dianthi* propagule number and was clearly unrelated to plant nutrition. The induction of the *D. caryophyllus* disease resistance mechanisms by the mycorrhizal fungus was not ruled out as a possible explanation for our results, but direct or indirect microbial interactions in soil also appear to be very important factors.

## Acknowledgement

We wish to thank L. Dumont for technical work, S. Daigle for advise on experimental design and statistical analysis, M. Fillion for helpful comments and P. Moutoglis for the revision of the linguistic content of the paper. The initial VAM inoculum was from leek roots colonized with *G. intraradices* and was kindly provided by Dr. V. Furlan (Agriculture Canada, Sainte-Foy, Canada). This research was supported by a NSERC operating grant to J. André Fortin.

## Literature cited

- Benhamou, N., Fortin, J. A., Hamel, C., St-Arnaud, M., and Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84: 958-968.
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., and Bonfante, P. 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193: 123-131.
- Blee, K. A., and Anderson, A. J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.
- Bonfante, P., and Perotto, S. 1995. Tansley review No. 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130: 3-21.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J. P., and Ricci, P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 181-192.
- Bremner, J. M., and Mulvaney, C. S. 1982. Nitrogen-total In *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. *Edited by* A. L. Page. American Society of Agronomy, Madison, Wis. pp. 595-624.
- Calvet, C., Barea, J. M., and Pera, J. 1992. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* 24: 775-780.
- Caron, M., Richard, C., and Fortin, J. A. 1986b. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 67: 15-19.
- Caron, M., Fortin, J. A., and Richard, C. 1986c. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.

- Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.
- Dhingra, O. D., and Sinclair, J. B. 1985. *Basic plant pathology methods*. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Draper, N. R., and Smith, H. 1981. *Applied regression analysis*. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York.
- Gianinazzi, S. 1991. Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agr. Ecos. Env.* 35: 105-120.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J. P., Trouvelot, A., and Duc, G. 1991. Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. *Advances in Molecular Genetics of Plant - Microbe Interactions*, Vol. 1, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, Netherlands. pp. 336-342.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumasgaudot, E., Lemoine, M. C., Vantuinen, D., and Gianinazzi, S. 1995. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73: S526-S532.
- Giovannetti, M., and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., and Logi, C. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709.
- Harrison, M. J., and Dixon, R. A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643-654.

- Harrison, M. J., and Dixon, R. A. 1994. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* 6: 9-20.
- Hewitt, E. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. East Malling.
- Koide, R., and Schreiner, R. 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol* 43: 557-581.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 114-124.
- Kormanik, P. P., and McGraw, A. C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots *In* Methods and principles of mycorrhizal research. *Edited by* N. C. Schenck. APS Press, St Paul Minn. pp. 37-45.
- Krishna, K. R., Balakrishna, A. N., and Bagyaraj, D. J. 1982. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeous* and their effects in finger millet. *New Phytol.* 92: 401-405.
- Kuč, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32: 854-860.
- Kuč, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control *In* Innovative approaches to plant disease control. *Edited by* I. Chet. Wiley & Sons, New York. pp. 255-274.
- Lambais, M. R., and Mehdy, M. C. 1993. Suppression of endochitinase, beta-1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 75-83.
- Lambais, M. R., and Mehdy, M. C. 1995. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can. J. Bot.* 73: S533-S540.



- Leeman, M., Vanpelt, J. A., Denouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 655-664.
- Lehmann, E. 1975. *Nonparametrics - Statistical methods based on ranks*. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, CA.
- Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Linderman, R. G., and Paulitz, T. C. 1990. Mycorrhizal-rhizobacterial interactions *In* *Biological control of soil-born plant pathogens*. Edited by D. Hornby, R. J. Cook, Y. Henis, W. H. Ko, A. D. Rovira, B. Schippers, and P. R. Scott. CAB International, Wallingford, UK. pp. 261-283.
- Meyer, J. R., and Linderman, R. G. 1986a. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. *Soil Biol Biochem* 18: 185-190.
- Meyer, J. R., and Linderman, R. G. 1986b. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 191-196.
- Morandi, D., Bailey, J. A., and Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 357-364.
- Newsham, K. K., Fitter, A. H., and Watkinson, A. R. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. *J. Ecol.* 83: 991-1000.
- Ocampo, J. A., Martin, J., and Hayman, S. D. 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. *New Phytol.* 84: 27-35.

- Paulitz, T. C., and Linderman, R. G. 1989. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 113: 37-45.
- Plank, C. O. 1992. Plant analysis reference procedures for the southern region of the United States. Southern cooperative series, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, Athens, Ga. Bull. 368.
- Posta, K., Marschner, H., and Römheld, V. 1994. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. *Mycorrhiza* 5: 119-124.
- Ravnskov, S., Jakobsen, I., Kragelund, L., and Nybroe, O. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on *Pseudomonas fluorescens* (DF57) in soils with and without roots. In *Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae*, Berkeley, Calif. Edited by M.T. Szaro, and T.D. Bruns. pp. 100-101.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H., and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841-11843.
- Rosendahl, S. 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathol. Z.* 114: 31-40.
- SAS Institute Inc. 1992. The SAS System for Windows 3.10, release 6.08. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Secilia, J., and Bagyaraj, D. J. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can. J. Microbiol.* 33: 1069-1073.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Smith, G. S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374.

- Smith, S. E., and Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A., and Bonfante-Fasolo, P. 1989. Chitinases in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
- Spanu, P., and Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxydase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119-124.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., and Fortin, J. A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Plant Pathol.* 16: 187-194.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M., and Fortin, J. A. 1995a. Endomycorrhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels *In La symbiose mycorrhizienne - État des connaissances. Edited by J. A. Fortin, C. Charest, and Y. Piché. Éditions Orbis Publishing, Frelighsburg, Qc. pp. 51-87.*
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M., and Fortin, J. A. 1995b. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza* 5: 431-438.
- STSC Inc. 1988. Statgraphics user's guide. STSC Inc., Rockville.
- Taylor, T. N., Remy, W., Hass, H., and Kerp, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560-573.
- Tester, M., Smith, S. E., and Smith, F. A. 1987. The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Can. J. Bot.* 65: 419-431.
- van Peer, R., Niemann, G. J., and Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.

- Vierheilig, H., Alt, M., Mader, P., Boller, T., and Wiemken, A. 1995. Spreading of *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, across the rhizosphere of host and non-host plants. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1113-1115.
- Vierheilig, H., Alt, M., Mohr, U., Boller, T., and Wiemken, A. 1994. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and beta-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.* 143: 337-343.
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y., and Kapulnik, Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Volpin, H., Phillips, D. A., Okon, Y., and Kapulnik, Y. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol.* 108: 1449-1454.

## *Chapitre 7*

### *Discussion générale*

Il y a près de 30 ans, la connaissance du rôle de la symbiose EVA dans le développement des maladies se résumait dans cette phrase que Gerdemann (1968) a utilisée dans un article de synthèse publié dans la prestigieuse revue *Annual Review of Phytopathology*: «Vesicular-arbuscular mycorrhizae may have no significant effect on the susceptibility of plants to disease, but without evidence we must not assume that this is true. »

Quelques années plus tard, ce même auteur (Gerdemann 1975) a tenté de cerner les processus impliqués dans la réduction des maladies par la symbiose EVA, à partir des quelques travaux pionniers sur le sujet. Il a suggéré, sur une base purement spéculative, que plusieurs des mécanismes avancés par Zak (1964) pour expliquer l'accroissement de résistance aux maladies des plantes ectomycorhiziennes pourraient aussi s'appliquer à la symbiose EVA. Ces mécanismes comprenaient (1) la production d'antibiotiques par le champignon, (2) la production de substances inhibitrices par la plante en réaction à l'infection par le champignon, (3) l'altération de l'exsudation racinaire réduisant l'attraction des zoospores et (4) la modification de la population microbienne de la rhizosphère, favorisant les microorganismes non-pathogènes au détriment des parasites.

Le rôle des champignons EVA dans la résistance aux maladies est alors devenu le sujet d'une attention plus soutenue et quelques années plus tard, Dehne (1982) publiait dans *Phytopathology* une synthèse qui est devenue la référence incontournable sur le sujet. Dans cet article, il résume les connaissances sur l'interaction entre les partenaires de la symbiose EVA et les parasites par (1) les champignons EVA peuvent retarder le développement des parasites dans les racines mais l'influence serait limitée aux points d'établissement du champignon, (2) les champignons EVA peuvent augmenter l'importance de la maladie de façon systémique, spécialement dans les portions non colonisées de la plante. L'auteur conclut en proposant que le mécanisme prépondérant,

sinon le seul mécanisme important pour expliquer la réponse des plantes EVA aux parasites serait l'assimilation accrue des nutriments, résultant en une augmentation de croissance et d'activité physiologique chez la plante. Il indique que certains autres mécanismes sont probablement impliqués, mais de façon plus restreinte et strictement localisée aux zones de colonisation par le champignon EVA.

### **Mécanismes liés à une modification de la nutrition.**

L'effet de la symbiose EVA sur la nutrition de la plante hôte, particulièrement l'augmentation d'assimilation du phosphore, est devenue, dès lors, l'hypothèse la plus souvent avancée pour expliquer la diminution des maladies. Caron et al. (1986c) ont été les premiers à montrer que ce mécanisme ne permettait pas toujours d'expliquer la réduction du développement d'une maladie et que d'autres mécanismes devaient nécessairement être impliqués. Jusqu'à maintenant, leur étude était la seule démonstration directe publiée de ce fait. L'altération de la nutrition phosphatée et ses conséquences sur la physiologie de l'hôte est cependant demeurée l'hypothèse prépondérante pour expliquer l'effet de la symbiose EVA sur les maladies des racines (Smith 1988) et en particulier sur les maladies à nématodes (Lopez et al. 1997; Pinochet et al. 1996).

Nous avons démontré, à l'aide de deux modèles expérimentaux distincts, que l'assimilation accrue de nutriments, sous l'effet du champignon EVA, n'est pas essentielle à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose. Nous avons montré que la croissance du *Pythium ultimum* dans les racines et dans le substrat de croissance du *Tagetes patula* est inhibée par l'inoculation mycorhizienne, sans égard à la disponibilité du phosphore (St-Arnaud et al. 1994b et chapitre 3). Cela confirme les résultats de Caron et al. (1986c) qui ont été obtenus à l'aide d'un système totalement différent (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* – tomate), minimisant ainsi la possibilité qu'il s'agisse d'un cas d'exemption, tel que suggéré précédemment (Smith 1988). Trotta et al. (1996) ont rapporté récemment une réduction similaire des dégâts causés par le

*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* chez la tomate inoculée par le *Glomus mosseae*, sans lien avec le niveau de phosphore de la solution nutritive.

Nous avons aussi démontré que la maladie causée par le *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* chez l'oeillet pouvait être réduite par la présence du *G. intraradices* (St-Arnaud et al. 1997 et chapitre 6) dans le substrat de culture. Cette démonstration est particulièrement significative car l'oeillet étant une espèce non mycorhizienne, la possibilité que la réduction de la maladie soit dûe à un effet nutritif devient virtuellement nulle. L'absence quasi totale d'arbuscules dans les racines de l'oeillet, ainsi que le contenu minéral identique en macro- et micro-éléments (N, P, K, Ca, Mg, B, Zn, Fe, Mn, Cu) entre les plants mis ou non en présence du champignon EVA indiquent que l'effet n'est manifestement pas relié à l'installation d'une symbiose fonctionnelle et n'est définitivement pas nutritif. À notre connaissance, c'est aussi la première fois qu'il est démontré que la présence d'un champignon EVA peut réduire le développement d'une maladie chez une espèce non mycorhizienne. Le *D. caryophyllus* a donc été protégée contre le *F. o. dianthi* par des mécanismes qui ne sont manifestement pas liés à un échange métabolique déterminé par la symbiose, entre le champignon EVA et la plante.

Outre les travaux mentionnés précédemment dans cette thèse, Niemira et al. (1996) ont aussi récemment obtenu des résultats ne s'accordant pas avec l'hypothèse voulant que la résistance aux maladies soit d'origine nutritive. Ces chercheurs ont rapporté une suppression des dégats post-récolte causés par le *Fusarium sambucinum* sur les minitubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.), sans indices d'augmentation de la nutrition phosphatée induite par l'inoculation EVA, ni changements dans la composition minérale des minitubercules.

## Compétition intraracinaire.

Il a parfois été suggéré qu'un haut niveau de colonisation mycorhizienne serait nécessaire pour assurer la protection d'une plante contre un parasite (Graham et Menge 1982; Smith 1988; Smith et al. 1986) et que, de ce fait, la compétition pour l'espace ou pour les ressources fournies par l'hôte pourrait être des mécanismes impliqués dans la réduction du développement des maladies (Smith 1988). Nous avons montré que la réduction du *Pythium ultimum* dans les racines et le substrat de culture n'est pas associée à la proportion des racines de tagètes contenant des structures fongiques EVA (St-Arnaud et al. 1994b et chapitre 3). Dans cette expérience, les jeunes plantules de tagètes ont été exposées au parasite au tout début de leur colonisation par le champignon mycorhizien et à un stade de sensibilité maximum au parasite. De plus, à la fin de l'expérience, au niveau de fertilisation phosphatée le plus élevé, la colonisation EVA des racines était presque négligeable (0.9–1.5 %), alors que la réduction du parasite a été statistiquement semblable à celle obtenue aux niveaux de colonisation EVA plus élevés (8.1–46.3 %). L'inhibition du *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* chez les oeillets a aussi montré, hors de tout doute, qu'un niveau de colonisation EVA minimum préalable à l'attaque par le parasite, n'était pas requis pour permettre la réduction de la maladie (St Arnaud et al. 1997 et chapitre 6). Bien qu'en fin d'expérience, les racines d'oeillets aient été colonisées à un niveau non négligeable (14.3–19.9 %) par des hyphes du *Glomus intraradices*, les plantules avaient été exposées au parasite et au champignon EVA simultanément. Ces résultats, obtenus avec deux modèles expérimentaux indépendants, montrent que l'inhibition du parasite n'est pas liée à l'importance de la colonisation racinaire par le champignon EVA, au moins dans le cas des maladies fongiques. Ceci élimine la possibilité qu'une compétition intraracinaire entre le champignon EVA et le parasite soit un mécanisme essentiel à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose.



## Résistance induite

La stimulation des mécanismes de résistance de la plante hôte par le champignon EVA est actuellement une hypothèse qui soulève beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. Elle a été proposée à plusieurs reprises pour expliquer la réduction de maladies chez les plantes EVA. La modification, suite à la colonisation mycorhizienne, de la présence des molécules associées à des réponses de défense, tels les phénols, phytoalexines, chitinases, peroxydases ou lignine, a été abondamment documenté dans les chapitres précédents (chapitres 2, 3 et 6). Essentiellement, les études les plus fines ont démontré que la colonisation mycorhizienne pouvait induire une activation légère et transitoire des sentiers métaboliques associés aux mécanismes de résistance, laquelle peut être suivie d'une suppression par comparaison avec les niveaux d'activité mesurés chez les témoins non-mycorhiziens. La plupart des chercheurs ont cependant abordé cette question de façon indirecte, dans le cadre d'études qui s'inscrivent dans une perspective de compréhension de la reconnaissance et de l'installation d'une symbiose fonctionnelle entre les partenaires de l'association EVA. Dans la seconde édition du volume *Mycorrhizal Symbiosis*, Smith et Read (1997) concluent à partir de ces travaux:

« it appears that rather than inducing major deployment of defence responses, mycorrhizal colonization may provoke a minor, transitory response which is followed by general suppression in both host and non-host plants » et plus loin « mobilization of plant defence mechanisms during mycorrhizal colonization, a possibility which now seems relatively unlikely. »

Cependant, dans à une collaboration ne faisant pas partie de mes travaux de thèse, nous avons montré (Benhamou et al. 1994) que les résultats pouvait être très différents si les plantes analysées étaient préalablement colonisées par le champignon EVA puis exposées à un parasite. À l'aide d'un système *in vitro* similaire à celui décrit précédemment dans cette thèse (chapitres 4 et 5), dans lequel des racines de carotte transformées par le plasmide Ri T-DNA ont été colonisées par le *G. intraradices*, nous avons observé une forte stimulation des mécanismes de résistance chez les racines mycorhiziennes lorsque celles-ci étaient inoculées avec le parasite *F. o. chrysanthemi* sept jours après l'inoculation EVA. Une substance de nature phénolique était produite de

*novo* dans les cellules et les espaces intercellulaires des racines mycorhiziennes et interagissait avec la paroi du parasite en produisant des altérations cytochimiques et en restreignant sa croissance à l'épiderme et au cortex externe. Ces résultats contrastaient fortement avec la croissance abondante du *F. o. chrysanthemi* et la dégradation des cellules observées dans les tissus des racines non mycorhiziennes, ainsi qu'avec la très faible présence de cette substance chez les racines inoculées avec le champignon EVA seul. De plus, plusieurs résultats récents viennent aussi appuyer l'hypothèse d'une activation des mécanismes de résistance par la colonisation endomycorhizienne. Il a été démontré par hybridation *in situ* que, même si les produits de gènes impliqués dans les réactions de défense ne sont pas significativement augmentés dans les racines EVA, des mRNA codant pour diverses enzymes (chitinase, phenylalanine ammonia-lyase et glucanase) s'accumulent dans les cellules contenant des arbuscules (Blee et Anderson 1996; Harrison et Dixon 1994). Kjoller et al. (1996) ont observé que chez des pois infectés par le parasite *Aphanomyces euteiches*, la précolonisation par un champignon EVA entraîne une réduction de l'activité de certaines enzymes du parasite et une diminution des symptômes de maladie, sans cependant que le niveau d'infection par le parasite ne soit modifié. Pozo et al. (1996) ont aussi observé récemment la formation d'un nouvel isoforme de chitinase chez la tomate mycorhizée. Ces travaux suggèrent que l'immunisation (systemic acquired resistance) est un mécanisme possible pour expliquer la réduction de la sévérité des maladies observée chez les plantes EVA. La réduction de sensibilité à la pourriture causée par le *Fusarium sambucinum* chez des minitubercules de pomme de terre produits en présence d'un inoculum EVA a été récemment attribuée à la résistance induite (Niemira et al. 1996).

L'immunisation peut être induite suite à l'attaque par un microorganisme pathogène ou par la blessure des tissus causée par l'activité d'un ravageur. Elle est contrôlée par des molécules signalisatrices transmissibles, lesquelles peuvent activer les mécanismes de résistance à distance du site envahi par le parasite ou endommagé par le ravageur (Enyedi et al. 1992). L'immunisation est induite par une gamme d'éliciteurs abiotiques et biotiques, incluant des métabolites microbiens (Lyon et al. 1995). L'activation des gènes de défense peut être aussi rapide que 2-3 min. après le traitement éliciteur (Lamb et al.

1989) et on a rapporté que les molécules signalisatrices potentiellement impliquées dans l'induction pouvaient circuler à travers la plante entière en moins d'une à quelques heures (Pearce et al. 1991). Cependant, on considère que pour obtenir une résistance significative, l'immunisation de tissus non infectés nécessite un délai minimum de quelques jours à quelques semaines suivant l'induction et avant la confrontation avec l'agent parasite (Bonnet et al. 1996; Kuć 1982, 1987; Leeman et al. 1995). Par exemple, van Peer et al. (1991) rapportent que l'inoculation de boutures du *D. caryophyllus* avec le *Pseudomonas* sp. réduit significativement les symptômes de la maladie causée par le *F. o. dianthi* par résistance induite si l'inoculation bactérienne a lieu une semaine avant la confrontation avec le parasite, mais pas lorsque les deux microorganismes sont inoculés simultanément. La résistance à une maladie est déterminée par la vitesse et l'amplitude avec lesquelles sont exprimées les informations génétiques associées aux mécanismes de résistance (Kuć 1982, 1987). Chez les plantes immunisées par une infection précédente, les précurseurs requis pour l'activation des mécanismes de résistance seraient conservés jusqu'à l'attaque suivante.

À la lumière de ces faits, il est clair que les résultats rapportés au chapitre 6 de cette thèse ne peuvent pas s'expliquer par une stimulation des mécanismes de résistance de la plante, suite à l'inoculation mycorrhizienne. Les semis du *D. caryophyllus* n'ont pas été soumis à une sensibilisation préalable, mais ont été plutôt exposés au parasite (*F. o. dianthi*) et au champignon EVA (*G. intraradices*) simultanément. De plus, la démonstration de l'accumulation des mRNA associés aux mécanismes de résistance, dans les cellules de racines colonisées par un champignon EVA, n'implique que les cellules contenant des arbuscules (Blee et Anderson 1996; Harrison et Dixon 1994) et aucune accumulation similaire n'a été détectée à proximité des hyphes ou des vésicules. Or ces structures sont virtuellement les seules qui ont été observées dans les racines d'oeillets. Il est donc très improbable que l'activation des mécanismes de résistance durant la colonisation mycorrhizienne ait contribué à la réduction de la maladie causée par le *F. o. dianthi* chez l'oeillet. Cela nous amène à proposer que même si, dans certaines circonstances, la résistance induite est vraisemblablement un mécanisme impliqué dans la réduction des maladies chez les plantes EVA, elle n'est pas essentielle à l'expression du

pouvoir protecteur de la symbiose dans tous les cas et d'autres mécanismes doivent nécessairement aussi être impliqués.

## Interaction microbiennes directes ou indirectes

La possibilité qu'une interaction microbienne extramatricielle soit impliquée dans la réduction du développement des maladies chez les plantes EVA est une hypothèse qui remonte aux premiers travaux sur le sujet (Gerdemann 1975). Elle a reçu beaucoup d'attention de la part de divers chercheurs, dont particulièrement Bagyaraj et ses collaborateurs, ainsi que Linderman et ses collaborateurs (la littérature à ce sujet est présentée aux chapitres 2, 3, 5 et 6). Essentiellement, il appert que la symbiose EVA entraîne des modifications qualitatives et quantitatives de la microflore tellurique, d'où le terme *mycorrhizosphere effect* (Linderman 1988) qui a été proposé pour décrire ces changements qui se produiraient non seulement à proximité des racines, mais aussi autour du mycélium extramatriciel des champignons EVA (Linderman et Paulitz 1990). Dans la plupart des études, les auteurs n'ont cependant pas été en mesure de distinguer entre (1) un effet direct du mycélium EVA sur la population microbienne du sol et (2) un effet indirect occasionné par une modification du métabolisme des racines EVA qui entraînerait un changement de la population microbienne dans la rhizosphère. Récemment, Posta et al. (1994) ont rapporté une influence positive des hyphes EVA sur la population microbienne du sol, à distance des racines de la plante hôte, ce qui supporte la première hypothèse sans la prouver hors de tout doute. De plus, une étude sur la fécondité d'une graminée annuelle, le *Vulpia ciliata* ssp. *ambigua*, suggère que les champignons EVA interagissent directement avec les parasites telluriques (Newsham et al. 1994).

Il n'existait, jusqu'à tout récemment, aucune démonstration directe d'un effet du mycélium extramatriciel d'un champignon EVA sur un microorganisme du sol. La principale difficulté consistait en l'absence d'un système expérimental approprié,

permettant la culture du champignon EVA sans la présence d'une plante hôte, ce qui rendait très difficile l'isolation d'un effet du champignon de l'effet des racines. Nous avons développé un tel système expérimental (St-Arnaud et al. 1996b et chapitre 4). Ce système de culture *in vitro* compartimenté permet d'obtenir un mycélium de champignon EVA aseptique et séparé de l'influence des racines hôtes, ce qui rend possible l'étude d'un effet direct sur un autre microorganisme dans des conditions monoxéniques. Ce système a en outre permis d'augmenter considérablement la sporulation du champignon en conditions *in vitro* par rapport aux travaux antérieurs ou contemporains (Bécard et Fortin 1988; Declerck et al. 1996; Diop et al. 1992, al. 1994; Millar-Wideman et Watrud 1984). Plenchette et al. (1996) ont récemment rapporté une baisse significative de l'infectivité des spores produites en culture *in vitro* après plusieurs cycles de repiquage des cultures. Contrairement à leurs observations, nous avons observé que dans un substrat approprié et après un court délai initial, la colonisation à partir de ces spores est similaire à celle obtenue à partir d'un inoculum conventionnel formé de fragments de racines de poireaux mycorrhiziens cultivés en serre (Vimard et al. 1996). Ces résultats ouvrent la possibilité d'une fabrication d'inoculum à grande échelle et ont servi de base à l'obtention d'un brevet US (Fortin et al. 1996). L'augmentation de la densité des hyphes et des spores du champignon EVA, favorisée par l'absence de substances non volatiles relâchées par les racines, nous a aussi permis de suggérer un nouveau rôle écologique aux exsudats racinaires (St-Arnaud et al. 1996b et chapitre 4). Nous proposons que des substances bioactives présentes dans les exsudats racinaires pourraient avoir un effet différent sur les diverses structures morphofonctionnelles des champignons EVA. Une concentration supérieure pourrait promouvoir la germination de spores, ainsi que le développement des structures infectieuses et des hyphes de colonisation (runner hyphae), mais réprimerait la sporulation et la formation des structures fortement ramifiées servant à l'absorption (absorptive hyphal networks), à proximité des racines. Les structures d'absorption et les spores seraient plutôt produites loin de l'influence des racines, dans une région du sol où les nutriments sont plus concentrés et où l'occupation est plus faible. Cette hypothèse s'accorde avec les observations directes sur l'architecture du mycélium dans le sol (Friese et Allen 1991).

Le système expérimental compartimenté *in vitro* nous a permis de démontrer pour la première fois un effet clair et direct d'une culture pure de champignon EVA sur un autre microorganisme (St-Arnaud et al. 1995b et chapitre 5). Sous des conditions qui excluent l'influence des racines hôtes et d'autres microorganismes, le mycélium de champignon EVA stimule clairement la germination des conidies et la croissance du mycélium du *F. o. chrysanthemi*. Ces résultats supportent l'hypothèse d'un effet direct du réseau extramatriciel des champignons EVA sur les microorganismes du sol, lequel pourrait entraîner une modification de l'équilibre microbien dans la mycorrhizosphère. Nous n'avons pas élucidé le mécanisme par lequel cet effet est produit mais nous croyons qu'un changement chimique du milieu environnant les hyphes est impliqué. Ce changement pourrait être causé par l'exsudation de substances organiques par le mycélium ou par une absorption préférentielle de certains ions, modifiant l'équilibre ionique de l'environnement des hyphes. Villegas et al. (1996), utilisant notre système expérimental, ont montré que le mycélium du champignon EVA a la capacité d'absorber de façon préférentielle certains ions et peut, de cette façon, changer le pH du milieu. Cependant, nous avons récemment observé, dans des conditions expérimentales relativement similaires, que le pH n'est pas en cause dans l'effet du *G. intraradices* sur le *F. o. chrysanthemi* (Filion et al. 1996). La production de substances bioactives est connue chez les champignons ectomycorhiziens (Marx 1972; Strzelczyk et Pokojaska-Burdziej 1984) et l'association physique entre certains microbes et les structures fongiques ectomycorhiziennes et endomycorhiziennes a été rapportée (Clough et Sutton 1978; Malajczuk 1979; Orozco et al. 1984; Paula et al. 1993; Tisdall et Oades 1979; Vancura et al. 1989). Cela implique que des substances sont excrétées ou relâchées par le mycélium des champignons EVA et utilisées comme nutriments par certains microorganismes. Certaines substances telles des polysaccharides (Clough et Sutton 1978) ou des acides aminés (Vancura et al. 1989) sont de bonnes sources de carbone ou d'azote et peuvent stimuler la croissance des spores de *Fusarium* (Griffin 1981).

Nous avons proposé deux hypothèses pour expliquer la contribution d'un effet stimulateur direct du réseau mycélien EVA sur certains microorganismes du sol dans la diminution de l'incidence des maladies infectieuses d'origine tellurique (St-Arnaud et al.

1995b et chapitre 5) : (1) Les propagules de parasites telluriques demeurent inactives dans le sol en raison soit d'une dormance ou de fongistase, une propriété naturelle du sol très répandue et qui se manifeste par une inhibition non spécifique des propagules (Lockwood 1977). La stimulation des propagules de parasites à proximité du réseau mycélien EVA, mais trop loin des racines, pourrait alors contribuer à réduire l'inoculum en le sensibilisant à la lyse par certains autres microorganismes ou par épuisement suite à une utilisation inutile des ressources énergétiques disponibles dans la propagule. Ce mécanisme de lyse à la germination (germination lysis; Papavizas et Lumsden 1980), bien connu dans le contexte de l'application d'engrais verts en agriculture durable, est proposé pour la première fois dans le contexte de la réduction des maladies chez les plantes EVA. (2) Une stimulation ou une sélection préférentielle, par le réseau mycélien EVA, de certains microorganismes habitant la mycorrhizosphère et ayant des propriétés d'antagoniste ou d'hyperparasite, pourrait contribuer aussi à réduire l'inoculum des parasites d'origine tellurique. La fongistase est un facteur majeur dans l'expression du potentiel de l'inoculum des espèces de *Trichoderma* dans le sol (Papavizas 1985) et pourrait aussi jouer un rôle dans le comportement des population d'autres microorganismes interagissant avec les parasites.

Nos résultats montrent aussi que l'antibiose, un mécanisme impliqué dans la réduction des maladies par les ectomycorhizes (Sylvia et Sinclair 1981; Tsantrizos et al. 1991) et qui a parfois été proposé pour expliquer l'effet protecteur de la symbiose endomycorhizienne (Caron et al. 1986c), ne se manifeste pas dans l'interaction entre le *G. intraradices* et le *F. o. chrysanthemi* sous nos conditions expérimentales. La synthèse d'antibiotiques par les bactéries et les champignons est déterminée par la source d'azote et de carbone, ainsi que par leur concentration (Stack et al. 1988). Elle est donc fortement fonction du substrat sur lequel le microorganisme vit. Dans nos travaux, le champignon EVA avait accès à un milieu nutritif riche, nécessaire à la croissance des racines transformées de carotte. Ce milieu contient de l'azote et du carbone sous une forme facilement assimilable et en quantité supérieure aux niveaux généralement disponibles dans un sol naturel. Il semble donc peu vraisemblable que de l'antibiose soit

produite par le champignon EVA en milieu naturel puisque ce mécanisme n'a pas été observé dans des conditions favorables.

Nos résultats en regard de l'expérience sur l'effet d'un champignon EVA sur le développement de la flétrissure fusarienne chez l'oeillet (St-Arnaud et al. 1997 et chapitre 6) apportent aussi un support important à l'hypothèse d'un effet direct du réseau mycélien EVA sur certains microorganismes du sol. La présence du champignon EVA a clairement diminué l'incidence de la maladie dans des conditions où, tel que discuté précédemment, ni un effet nutritionnel sur la plante hôte, ni la compétition intraracinaire entre champignons, ni la stimulation des mécanismes de résistance ne peuvent être des mécanismes ayant joué un rôle significatif. Il est donc probable que l'établissement du réseau mycélien EVA dans le sol avant l'inoculation du parasite ait soit (1) engendré une modification de l'équilibre microbien défavorable à l'établissement du parasite, ou (2) que le réseau d'hyphes EVA ait interagit directement avec le parasite de façon similaire à ce que nous avons observé en conditions *in vitro*. Cela expliquerait la diminution de la mortalité des semis d'oeillets dans les pots inoculés avec le champignon EVA et s'accorderait avec l'hypothèse d'un effet direct de la phase extramatricielle du champignon EVA sur le parasite ou sur l'équilibre microbien de la mycorrhizosphère. Une différence d'activité physiologique entre les *T. patula* mycorrhiziens et non colonisées pourrait aussi avoir influencé la population microbienne du substrat et créé un environnement antagoniste envers le parasite. Nos travaux ne permettent pas de conclure de façon certaine entre les différentes hypothèses possibles sur le mécanisme par lequel le réseau EVA influence l'équilibre microbien du sol. Nos résultats démontrent cependant clairement qu'un mécanisme basé sur une interaction directe ou indirecte entre le réseau EVA et le parasite est important dans la réduction des maladies chez les plantes EVA et que son rôle peut, dans certaines conditions être prépondérant.



## ***Conclusion générale***

Dans le cadre de cette thèse, nous avons voulu étudier la contribution de divers mécanismes potentiels afin de préciser ceux qui jouent un rôle significatif dans l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules. Cela nous a permis d'apporter une contribution significative à l'avancement de cette discipline, en montrant que: (1) l'assimilation accrue de nutriments, sous l'effet du champignon EVA, n'est pas essentielle à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose; (2) la présence d'un champignon EVA peut réduire le développement d'une maladie chez une espèce non mycorhizienne, par conséquent certains mécanismes impliqués dans la réduction du développement de maladies ne sont manifestement pas liés à un échange métabolique déterminé par la symbiose, entre le champignon EVA et la plante; (3) l'inhibition d'un parasite n'est pas liée à l'importance de la colonisation racinaire par le champignon EVA, au moins dans le cas des maladies fongiques, ce qui élimine la possibilité qu'une compétition intraracinaire entre le champignon EVA et le parasite soit un mécanisme essentiel à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose; (4) quoique que la résistance induite soit un mécanisme vraisemblablement impliqué dans la réduction des maladies chez les plantes EVA dans certaines conditions, elle n'est pas essentielle à l'expression du pouvoir protecteur de la symbiose dans tous les cas et d'autres mécanismes sont nécessairement impliqués; (5) sous des conditions qui excluent l'influence des racines hôtes et d'autres microorganismes, le mycélium de champignon EVA peut clairement influencer le comportement d'un autre microorganisme; (6) l'antibiose n'est pas un mécanisme impliqué dans l'interaction directe entre le *G. intraradices* et le *F. o. chrysanthemi* sous nos conditions expérimentales; (7) un mécanisme basé sur une interaction directe ou indirecte entre le réseau EVA et le parasite est impliqué dans la réduction des maladies chez les plantes EVA et son rôle peut, dans certaines conditions être prépondérant dans la réduction d'une maladie. En marge du sujet de cette thèse, nous avons aussi montré que la sporulation et la densité mycélienne du *Glomus intraradices* sont augmentés considérablement lorsque le mycélium est séparé de l'influence des racines hôtes, ce qui suggère que des substances bioactives présentes

dans les exsudats racinaires pourraient avoir un effet différent sur les diverses structures morphofonctionnelles des champignons EVA.

Comme l'ont souligné divers auteurs (Bagyaraj 1984; Dehne 1982; Garcia-Garrido et Ocampo 1988b), la diversité des interactions entre champignons EVA et microorganismes pathogènes des plantes est telle que chaque combinaison pourrait bien être unique et que les généralisations en ce domaine doivent être faites avec beaucoup de précautions. Il ne faut pas perdre de vue, comme l'ont suggéré Halbrock et al. (1986) dans un contexte similaire, que nos connaissances sur le sujet représentent la moyenne de plusieurs interactions plante-champignon EVA-parasite, mais pas nécessairement chaque cas individuel. Il est probable que plusieurs mécanismes interviennent simultanément dans toute interaction entre une plante EVA et un parasite. Leur contribution respective dans l'inhibition des parasites et des symptômes des maladies varie aussi probablement selon la plante hôte, le microorganisme pathogène et l'espèce ou la souche de champignon endomycorhizien impliquée, ainsi qu'en fonction des conditions de l'environnement.

Malgré cette grande complexité, il apparaît clairement que la symbiose EVA présente un potentiel important en lutte biologique. Bethlenfalvay et Linderman (1992) ont souligné, dans un livre sur le rôle des champignons mycorhiziens en agriculture durable, que le potentiel des champignons EVA pour l'augmentation de productivité des récoltes est bien reconnu, mais malheureusement mal exploité. Il existe maintenant plusieurs sources commerciales d'inoculum, à une échelle suffisante pour permettre l'inoculation de productions agricoles importantes. Il est maintenant urgent de réexaminer l'ensemble des pratiques culturales en fonction non pas seulement de la performance d'une culture cible dans certaines conditions particulières, mais plutôt en fonction d'un équilibre harmonieux entre la plante et son partenaire fongique. La plante, le champignon et le sol ne devraient plus être considérés comme des entités indépendantes, mais plutôt comme des partenaires complémentaires et indivisibles, lorsqu'on cherchera à comprendre l'effet d'un traitement sur le comportement d'une culture. De cette façon seulement, pourra-t-on profiter au maximum des bénéfices de cette symbiose sur la santé

des plantes, autant par une meilleure assimilation des nutriments que par la réduction des maladies et de stress abiotiques comme la sécheresse et le froid.

## ***Bibliographie générale***

- Ames, R.N., Reid, C.P.P. et Ingham, E.R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 96: 555-563.
- An, Z.Q. et Hendrix, J.W. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261.
- Atilano, R.A., Rich, J.R., Ferris, H. et Menge, J.A. 1976. *Meloidogyne arenaria* on endomycorrhizal grape (*Vitis vinifera*) rootings. *J. Nematol.* 8: 278-279.
- Ayers, W.A. et Adams, P.B. 1981. Mycoparasitism and its application to biological control of plant diseases. *Dans* Biological control in crop production, Beltsville symposium in agricultural research. *Édité par* G.C. Papavizas. Allenheld, Totowa, NJ. p. 91.
- Azcón, R. 1987. Germination and hyphal growth of *Glomus mosseae* *in vitro*: effects of rhizosphere bacteria and cell-free culture media. *Soil Biol. Biochem.* 19: 417-419.
- Azcón, R. 1989. Selective interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* 21: 639-644.
- Azcón-Aguilar, C. et Barea, J.M. 1992. Interactions between mycorrhizal fungi and other rhizosphere microorganisms *Dans* Mycorrhizal Functioning. *Édité par* M.F. Allen. Chapman & Hall, London. pp. 163-198.
- Azcón-Aguilar, C., Diaz-Rodriguez, R. et Barea, J.-M. 1986. Effects of soil microorganisms on spore germination and growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 86: 337-340.
- Bååth, E. et Hayman, D.S. 1983. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae XIV. Interactions with *Verticillium* wilt on tomato plants. *New Phytol.* 95: 419-426.

- Baghel, P.P.S., Bhatti, D.S. et Jalali, B.L. 1990. Interaction of VA mycorrhizal fungus and *Tylenchulus semipenetrans* on Citrus. Dans Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. Édité par B.L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 118-119.
- Bagyaraj, D.J. 1984. Biological interactions with VA mycorrhizal fungi. Dans VA mycorrhiza. Édité par L.L. Conway, D. Powell et D.J. Bagyaraj. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 131-153.
- Bagyaraj, D.J., Manjunath, A. et Reddy, D.D.R. 1979. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhiza with root knot nematodes in tomato. Plant Soil 51: 397-403.
- Bagyaraj, D.J. et Menge, J.A. 1978. Interaction between a VA mycorrhiza and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora. New Phytol. 80: 567-573.
- Baker, K.F. et Cook, R.J. 1974. *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman. San Francisco, CA.
- Bali, M. et Mukerji, K.G. 1988. Effect of VAM fungi on Fusarium wilt of cotton and jute. Dans Proceedings of the Asiatic Conference on Mycorrhizae. Édité par A. Mahadevan, N. Raman et K. Natarajan. Madras, India. pp. 233-234.
- Baltruschat, H. et Schönbeck, F. 1972. Untersuchungen über den einfluß der endotrophen mycorrhiza auf die chlamydosporen bildung von *Thielaviopsis basicola* in Tabakwurzeln. Phytopathol. Z. 74: 358-361.
- Baltruschat, H. et Schönbeck, F. 1975. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf den Befall von Tabak mit *Thielaviopsis basicola*. Phytopathol. Z. 84: 172-188.
- Barnard, E.L. 1977. The mycorrhizal biology of *Lyriodendron tulipifera* and its relationship to *Cylindrocladium* root rot. Thèse de PhD, Duke Univ., NC.
- Bärtschi, H., Gianinazzi-Pearson, V. et Vegh, I. 1981. Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root rot disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. Phytopathol. Z. 102: 213-218.

- Bécard, G., Doude, D.D. et Pfeffer, P.E. 1992. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 821-825.
- Bécard, G. et Fortin, J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 108: 211-218.
- Bécard, G. et Piché, Y. 1989a. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2320-2325.
- Bécard, G. et Piché, Y. 1989b. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* 112: 77-83.
- Bécard, G. et Piché, Y. 1992. Establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology *Dans Techniques for the study of mycorrhiza. Édité par J. Norris, D. Read et A. Varma. Academic Press, New York.* pp. 89-108.
- Becker, W.N. 1976. Quantification of onion vesicular-arbuscular mycorrhizae and their resistance to *Pyrenochaeta terrestris*. Thèse de PhD, Univ. IL.
- Benhamou, N., Fortin, J.A., Hamel, C., St-Arnaud, M. et Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84: 958-968.
- Bethlenfalvay, G. et Linderman, R. 1992. Mycorrhizae in sustainable agriculture. ASA special publication number 54, American Society of Agronomy. Madison, WI.
- Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S. et Bonfante, P. 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193: 123-131.
- Blee, K.A. et Anderson, A.J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. *Plant Physiol.* 110: 675-688.

- Bochow, H. et Abou-Shaar, M. 1990. On the phytosanitary effect of VA-mycorrhiza in tomatoes to the corky-root disease. *Zentralbl. Mikrobiol.* 145: 171-176.
- Bonfante, P. et Perotto, S. 1995. Tansley review No. 82 - Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol.* 130: 3-21.
- Bonnet, P., Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J.P. et Ricci, P. 1996. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 102: 181-192.
- Boyetchko, S.M. et Tewari, J.P. 1988. The effect of VA mycorrhizal fungi on infection by *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Can. J. Plant Pathol.* 10: 361.
- Boyetchko, S.M. et Tewari, J.P. 1990. Effect of phosphorus and VA mycorrhizal fungi on common root rot of barley *Dans* Innovation and integration. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae, Jackson, WY. pp. 33.
- Bray, R. et Kurtz, L. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus. *Soil Sci.* 59: 39-42.
- Bremner, J.M. et Mulvaney, C.S. 1982. Nitrogen-total *Dans* Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. *Édité par* A.L. Page. American Society of Agronomy, Madison, WY. pp. 595-624.
- Calvet, C., Barea, J.M. et Pera, J. 1992. *In vitro* interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and some saprophytic fungi isolated from organic substrates. *Soil Biol. Biochem.* 24: 775-780.
- Camprubi, A., Pinochet, J., Calvet, C. et Estaun, V. 1993. Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of three plum rootstocks. *Plant Soil* 153: 223-229.
- Caron, M. 1989a. Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 177-179.
- Caron, M. 1989b. Problématique de l'utilisation des champignons endomycorrhiziens comme agents de lutte biologique. *Phytoprotection* 70: 43-49.

- Caron, M., Fortin, J.A. et Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. *Plant Soil* 87: 233-239.
- Caron, M., Fortin, J.A. et Richard, C. 1986a. Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes over a twelve-week period. *Can. J. Bot.* 64: 552-556.
- Caron, M., Fortin, J.A. et Richard, C. 1986b. Effect of inoculation sequence on the interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes. *Can. J. Plant Pathol.* 8: 12-16.
- Caron, M., Fortin, J.A. et Richard, C. 1986c. Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on Fusarium root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946.
- Caron, M., Richard, C. et Fortin, J.A. 1986d. Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on Fusarium crown and root rot of tomatoes. *Phytoprotection* 67: 15-19.
- Catska, V. 1994. Interrelationships between vesicular-arbuscular mycorrhiza and rhizosphere microflora in apple replant disease. *Biol. Plant.* 36: 99-104.
- Chabot, S., Bécard, G. et Piché, Y. 1992a. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia* 84: 315-321.
- Chabot, S., Bel-Rhlid, R., Chênevert, R. et Piché, Y. 1992b. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. *New Phytol.* 122: 461-467.
- Chakravarty, P. et Mishra, R.R. 1986a. Influence of endotrophic mycorrhizae on the fusarial wilt of *Cassia tora* L. *J. Phytopathol. (Berl.)* 115: 130-133.
- Chakravarty, P. et Mishra, R.R. 1986b. The influence of VA mycorrhizae on the wilting of *Albizia procera* and *Dalbergia sissoo*. *Eur. J. For. Pathol.* 16: 91-97.



- Chou, L.C. et Schmitthener, A.F. 1974. Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mosseae* on soybean root rot caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. Plant Dis. Rep. 58: 221-225.
- Christensen, H. et Jakobsen, I. 1993. Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L). Biol. Fert. Soils 15: 253-258.
- Chulan, A.H., Shaji, G.T. et Christine, Z.A. 1990. Interactions of mycorrhizal fungi with root pathogen of cocoa *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. *Édité par* B.L. Jalali et H. Chand, Hisar India. pp. 78-79.
- Clough, K.S. et Sutton, J.C. 1978. Direct observations of fungal aggregates in sand dune soil. Can. J. Microbiol. 24: 333-335.
- Codignola, A., Verotta, L., Spanu, P., Maffei, M., Scannerini, S. et Bonfante-Fasolo, P. 1989. Cell wall bound-phenols in roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. New Phytol. 112: 221-228.
- Cole et Lim *in* Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115-1119.
- Cole et Mokhtar *in* Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathology 72: 1115-1119.
- Cook, R. et Baker, K. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. APS Press. St-Paul.
- Cook, R.J. 1982. Progress toward biological control of plant pathogens, with special reference to take-all of wheat. Agric For Bull 5: 22.
- Cooper, K.M. et Grandison, G.S. 1987. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on infection of tamarillo (*Cyphomandra betacea*) by *Meloidogyne incognita* in fumigated soil. Plant Dis. 71: 1101-1107.

- Curl, E.A. et Truelove, B. 1986. The rhizosphere. Advanced series in agriculture sciences, Vol. 15, Springer-Verlag. New York.
- Daft, M.J. et Okusanya, B.O. 1973. Effect of Endogone mycorrhizae on plant growth. V. Influence of infection on the multiplication of virus in tomato, petunia and strawberry. *New Phytol.* 72: 975-983.
- Davis, R.M. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* on *Thielaviopsis basicola* root rot of Citrus. *Plant Dis.* 64: 839-840.
- Davis, R.M. et Menge, J.A. 1980. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on Phytophthora root rot of Citrus. *Phytopathology* 70: 447-452.
- Davis, R.M. et Menge, J.A. 1981. *Phytophthora parasitica* inoculation and intensity of vesicular-arbuscular mycorrhizae in Citrus. *New Phytol.* 87: 705-715.
- Davis, R.M., Menge, J.A. et Erwin, D.C. 1979. Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456.
- Davis, R.M., Menge, J.A. et Zentmyer, G.A. 1978. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae on Phytophthora root rot of three crop plants. *Phytopathology* 68: 1614-1617.
- Deakin, M.A.B. 1990. Catastrophe modelling in the biological sciences. *Acta Biotheor.* 38: 3-22.
- Declerck, S., Strullu, D.G. et Plenchette, C. 1996. In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycological Research* 100: 1237-1242.
- Dehne, H.-W. 1977. Untersuchungen über den Einfluss der endotrophen Mycorrhiza auf die Fusarium-Welke an Tomate und Gurke. Thèse de PhD, Univ. Bonn, Germany.
- Dehne, H.-W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72: 1115-1119.

- Dehne, H.-W. 1987a. VA mycorrhizae and plant health *Dans* Mycorrhizae in the next decade. Practical applications and research priorities. Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. *Édité par* D.M. Sylvia, L.L. Hung et J.H. Graham. Gainesville, FL. pp. 192.
- Dehne, H.-W. 1987b. Zur Zutung der Mykorrhiza als Antistreibfaktor. *Angew Botanik* 61: 135-143.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1975. The influence of endotrophic mycorrhizae on the Fusarium wilt of tomato. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 82: 630-632.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1979a. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten I. Ausbreitung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Tomaten. *Phytopathol. Z.* 95: 105-110.
- Dehne, H.-W. et Schönbeck, F. 1979b. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten II. Phenolstoffwechsel und Lignifizierung. *Phytopathol. Z.* 95: 210-216.
- Dehne, H.-W., Schönbeck, F. et Baltruschat, H. 1978. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten 3. Chitinase-aktivität und Ornithinzyklus. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 85: 666-678.
- Dhingra, O.D. et Sinclair, J.B. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press. Boca Raton, Fla.
- Diop, T.A., Bécard, G. et Piché, Y. 1992. Long-term *in vitro* culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. *Symbiosis* 12: 249-259.
- Diop, T.A., Plenchette, C. et Strullu, D.G. 1994. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5: 17-22.
- Doner, L.W. et Bécard, G. 1991. Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol. Techniques* 5: 25-28.

- Draper, N.R. et Smith, H. 1981. Applied regression analysis. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York.
- Dumas, E., Gianinazzi-Pearson, V. et Gianinazzi, S. 1989. Production of new soluble proteins during VA endomycorrhiza formation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 111-114.
- Dumas, E., Tahiri-Alaoui, A., Gianinazzi, S. et Gianinazzi-Pearson, V. 1990. Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles *Dans Endocytobiology. Édité par P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A.M. Grenier, L. Margulis et D.C. Smith.* INRA Press, Paris. pp. 153-157.
- Dumas-Gaudot, E., Furlan, V., Grenier, J. et Asselin, A. 1992. New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 1: 133-136.
- Enyedi, A., Yalpani, N., Silverman, P. et Raskin, I. 1992. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70: 879-886.
- Feldmann, F., Junquiera, N.T.V. et Lieberei, R. 1989. Utilization of VA-mycorrhiza as a factor in integrated plant protection. *Agric. Ecosyst. & Environ.* 29: 131-135.
- Filion, M., St-Arnaud, M. et Fortin, J.A. 1996. Negative effect of soluble substances released by the VAM fungus *Glomus intraradices* on the *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* conidial germination in an *in vitro* system *Dans Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae, Berkeley, CA.* pp. 49.
- Fortin, J.A., St-Arnaud, M., Hamel, C., Chavarie, C. et Jolicoeur, M. 1996. *In vitro* production of mycorrhizal inoculum. US Patent Number 5,554,530.
- Fox, J.A. et Spasoff, L. 1972. Interaction of *Heterodera solanacearum* and *Endogone gigantea* on tobacco. *J. Nematol.* 4: 224-225.
- Francl, L.J. et Dropkin, V.H. 1985. *Glomus fasciculatum*, a weak pathogen of *Heterodera glycines*. *J. Nematol.* 17: 470-475.

- Friese, C.F. et Allen, M.F. 1991. The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: Inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia* 83: 409-418.
- Garcia-Garrido, J.M. et Ocampo, J.A. 1987. Interaction entre micorrizas va y organismos patogenos de plantas. *An. Edafol. Agrobiol.* 46: 1233-1245.
- Garcia-Garrido, J.M. et Ocampo, J.A. 1988a. Interaccion entre *G. mosseae* y *Pseudomonas syringae* en la rizosfera de plantas de tomate. *An. Edafol. Agrobiol.* 47: 1679-1686.
- Garcia-Garrido, J.M. et Ocampo, J.A. 1988b. Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol.* 110: 551-555.
- Garcia-Garrido, J.M. et Ocampo, J.A. 1989. Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol. Biochem.* 21: 165-167.
- Gerdemann, J. 1968. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annu. Rev. Phytopathol.* 6: 397-418.
- Gerdemann, J.W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae *Dans* The development and function of roots. *Édité par* J.G. Torrey et D.T. Clarkson. Academic Press, New York. NY. pp. 575-591.
- Gianinazzi, S. 1991. Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas: cellular, biochemical and genetic aspects. *Agr. Ecos. Env.* 35: 105-120.
- Gianinazzi-Pearson, V., Branzanti, B. et Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J.P., Trouvelot, A. et Duc, G. 1991. Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. *Dans* Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Vol. 1, Kluwer Academic Publ. Dordrecht, Netherlands. pp 336-342.

- Gianinazzi-Pearson, V., Gollotte, A., Lherminier, J., Tisserant, B., Franken, P., Dumas-Gaudot, E., Lemoine, M.C., Vantuinen, D. et Gianinazzi, S. 1995. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. *Can. J. Bot.* 73: S526-S532.
- Gianinazzi-Pearson, V., Tahiri-Alaoui, A., Antoniw, J.F., Gianinazzi, S. et Dumas, E. 1992. Weak expression of the pathogenesis related PR-b1 gene and localization of related protein during symbiotic endomycorrhizal interactions in tobacco roots. *Endocytobiosis Cell Res.* 8: 177-185.
- Giovannetti, M. et Citernesi, A.S. 1993. Time-course of appressorium formation on host plants by arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 97: 1140-1142.
- Giovannetti, M. et Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84: 489-500.
- Giovannetti, M., Sbrana, C. et Logi, C. 1994. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 127: 703-709.
- Giovannetti, M., Tosi, L., Delatorre, G. et Zizzerini, A. 1991. Histological, physiological and biochemical interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae and *Thielaviopsis basicola* in tobacco plants. *Phytopathol. Z.* 131: 265-274.
- Gonçalves, E.J., Muchovej, J.J. et Muchovej, R.M.C. 1991a. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA-mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. 2. Temporal-spatial relationships. *Plant Soil* 132: 47-51.
- Gonçalves, E.J., Muchovej, J.J. et Muchovej, R.M.C. 1991b. Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA-mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. I. Fungal and plants parameters. *Plant Soil* 132: 41-46.
- Graham, J.H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions with pathogens. *Hortscience* 21: 1302-1306.

- Graham, J.H. 1988. Interaction of mycorrhizal fungi with soilborne plant pathogens and other organisms: An introduction. *Phytopathology* 78: 365-366.
- Graham, J.H. et Egel, D.S. 1988. Phytophthora root rot development on mycorrhizal and phosphorus-fertilized nonmycorrhizal sweet orange seedlings. *Plant Dis.* 72: 611-614.
- Graham, J.H. et Menge, J.A. 1982. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology* 72: 95-98.
- Grandmaison, J., Olah, G.M., Van Calsteren, M.-R. et Furlan, V. 1993. Characterisation and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164.
- Griffin, G. 1981. Physiology of conidium and chlamyospore germination in *Fusarium* *Dans Fusarium: diseases, biology, and taxonomy. Édité par* P. Nelson, T. Toussoum et R. Cook. The Pennsylvania St. Univ. Press, University Park, London. pp. 331-339.
- Halbrock, K., Cuyper, B., Douglas, C., Fritze, K.H., Hoffmann, H., Rohwer, F., Scheel, D. et Schulz, W. 1986. Biochemical interactions of plants with potentially pathogenic fungi *Dans Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions. Édité par* B. Lugtenberg. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp. 311-323.
- Hale, M.G., Moore, L.D. et Griffin, G.J. 1978. Root exudates and exudation *Dans Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Édité par* Y.R. Dommergues et S.V. Krupa. Elsevier Scientific Pub. Co., New York. NY. pp. 103-203.
- Halos, P.M. et Zorilla, R.A. 1979. Vesicular-arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *Pseudomonas solanacearum*. *Phillipp. Agr.* 62: 309-315.
- Harrison, M.J. et Dixon, R.A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal

- associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 643-654.
- Harrison, M.J. et Dixon, R.A. 1994. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* 6: 9-20.
- Hewitt, E. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2nd ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. East Malling.
- Hung, L.-L. et Sylvia, D.M. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 353-357.
- Hussey, R.S. et Roncadori, R.W. 1977. Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and an endomycorrhizal fungus on cotton. *J. Nematol.* 9: 270-271.
- Hussey, R.S. et Roncadori, R.W. 1978. Interaction of *Pratylenchus brachyurus* and *Gigaspora margarita* on cotton. *J. Nematol.* 10: 16-20.
- Hussey, R.S. et Roncadori, R.W. 1982. Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Dis.* 66: 9-14.
- Hwang, S.F., Chakravarty, P. et Prévost, D. 1993. Effects of rhizobia, metalaxyl, and VA mycorrhizal fungi on growth, nitrogen fixation, and development of *Pythium* root rot of sainfoin. *Plant Dis.* 77: 1093-1098.
- Hwang, S.F., Chang, K.F. et Chakravarty, P. 1992. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of *Verticillium* and *Fusarium* wilts of alfalfa. *Plant Dis* 76: 239-243.
- Idczak, E., Feldmann, F. et Lieberei, R. 1991. Specific response of two Poinsettia varieties to *Pythium ultimum* and VAM *Dans Mycorrhizas in Ecosystems - Structure and Function*. Proceedings of the 3rd European Symposium on Mycorrhiza, Sheffield. England.
- Ingrouille, M. 1992. Diversity and evolution of land plants. Chapman & Hall. London.



- Iqbal, S.H. et Mahmood, T. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in *Brassica napus*. *Biologia (Lahore)* 32: 193-200.
- Iqbal, S.H., Nasim, G. et Niaz, M. 1987a. I. Role of VA mycorrhiza as a deterrent against pathogenic infections caused by *Fusarium moniliforme* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 33: 271-278.
- Iqbal, S.H., Nasim, G. et Niaz, M. 1987b. VA mycorrhiza as a deterrent to mixed pathogenic infections by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium moniliforme* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 33: 201-208.
- Iqbal, S.H., Nasim, G. et Niaz, M. 1988a. II. Role of vesicular-arbuscular mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* in *Brassica oleracea*. *Biologia (Lahore)* 34: 79-84.
- Iqbal, S.H., Nasim, G. et Niaz, M. 1988b. IV. VA mycorrhiza as a deterrent to damping-off caused by *Rhizoctonia solani* at different temperatures regimes. *Biologia (Lahore)* 34: 215-222.
- Jabaji-Hare, S.H. et Stobbs, L.W. 1984. Electron microscopic examination of tomato roots infected with *Glomus* sp. and tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 74: 277-279.
- Jain, R.K. et Sethi, C.L. 1987. Pathogenecity of *Heterodera cajani* on cowpea as influenced by the presence of VAM fungi, *Glomus fasciculatum* or *G. epigaeus*. *Indian J. Nematol.* 17: 165-170.
- Jalali, B.L. et Hisar, H.A.U. 1991. Mycorrhizal systems in management of plant diseases. *Mycorrhiza news (Asia)* 3: 3.
- Jeffers, S.N. et Martin, S.B. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70: 1038-1043.
- Jones, K. et Hendrix, J.W. 1987. Inhibition of root extension in tobacco by the mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* and its prevention by benomyl. *Soil Biol. Biochem.* 19: 297-299.

- Kaye, J.W., Pflieger, F.L. et Stewart, E.L. 1984. Interaction of *Glomus fasciculatum* and *Pythium ultimum* on greenhouse-grown poinsettia. *Can. J. Bot.* 62: 1575-1579.
- Kellam, M.K. et Schenck, N.C. 1980. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root-knot nematode on soybean. *Phytopathology* 70: 293-296.
- Khadge, B.R., Ilag, L.L. et Mew, T.W. 1990. Interaction study of *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani* Dans Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. Édité par B.L. Jalali et H. Chand, Hisar, India. pp. 94-95.
- Kjoller, R. et Rosendahl, S. 1996. The presence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* influences enzymatic activities of the root pathogen *Aphanomyces euteiches* in pea roots. *Mycorrhiza* 6: 487-491.
- Koide, R. et Schreiner, R. 1992. Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol* 43: 557-581.
- Komada, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.* 8: 114-124.
- Kormanik, P.P. et McGraw, A.C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots Dans Methods and principles of mycorrhizal research. Édité par N.C. Schenck. APS Press, St Paul, MN. pp. 37-45.
- Krishna, K.R. et Bagyaraj, D.J. 1983. Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Can. J. Bot.* 61: 2349-2351.
- Krishna, K.R., Balakrishna, A.N. et Bagyaraj, D.J. 1982. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamomeous* and their effects in finger millet. *New Phytol.* 92: 401-405.
- Kuč, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32: 854-860.

- Kuć, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control *Dans Innovative approaches to plant disease control. Édité par I. Chet. Wiley & Sons, New York. pp. 255-274.*
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. et Dixon, R.A. 1989. Signals and transduction mechanisms for the activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224.
- Lambais, M.R. et Mehdy, M.C. 1993. Suppression of endochitinase, beta-1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 75-83.
- Lambais, M.R. et Mehdy, M.C. 1995. Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can. J. Bot.* 73: S533-S540.
- Leeman, M., Vanpelt, J.A., Denouden, F.M., Heinsbroek, M., Bakker, P.A.H.M. et Schippers, B. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 101: 655-664.
- Lehmann, E. 1975. *Nonparametrics - Statistical Methods Based on Ranks. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, Cal.*
- Lieberei, R. et Feldmann, F. 1989. Physiological changes in roots colonized by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi - reactions in mutualistic and parasitic interactions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 251-255.
- Linderman, R.G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- Linderman, R.G. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions *Dans Mycorrhizae in sustainable agriculture. Édité par G.J. Bethlenfalvay et R.G. Linderman. American Society of Agronomy, Madison, WI. pp. 45-70.*

- Linderman, R.G. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol *Dans Mycorrhizae and plant health. Édité par* F.L. Pflieger et R.G. Linderman. APS Press, St. Paul, MN. pp. 1-25.
- Linderman, R.G. et Paulitz, T.C. 1990. Mycorrhizal-rhizobacterial interactions *Dans Biological control of soil-born Plant Pathogens. Édité par* D. Hornby, R.J. Cook, Y. Henis, W.H. Ko, A.D. Rovira, B. Schippers et P.R. Scott. CAB International, Wallingford, UK. pp. 261-283.
- Lockwood, J.L. 1977. Fungistasis in soils. *Biol Rev* 52: 1-43.
- Lopez, A., Pinochet, J., Fernandez, C., Calvet, C. et Camprubi, A. 1997. Growth response of OHF-333 pear rootstock to arbuscular mycorrhizal fungi, phosphorus nutrition and *Pratylenchus vulmus* infection. *Fundamental and Applied Nematology* 20: 87-93.
- Lucas, R., Rieke, P. et Doll, E. 1972. Soil saturated extract method for determining plant-nutrient levels in peats and other soil mixes *Dans 4th International peat congress, Otaniemi, Finland.* pp. 221-230.
- Lyon, G.D., Reglinski, T. et Newton, A.C. 1995. Novel disease control compounds: The potential to 'immunize' plants against infection. *Plant Pathol.* 44: 407-427.
- Mahmood, T. et Iqbal, S.H. 1982. Influence of soil moisture contents on VA mycorrhizal and pathogenic infection by *Rhizoctonia solani* in *Brassica napus*. *Pak. J. Agric. Res.* 3: 45-49.
- Mahmood, T. et Khurshid, T. 1988. Comparative study of VA mycorrhizae and root infecting fungi in wheat roots. *Biologia (Lahore)* 34: 303-308.
- Malajczuk, N. 1979. The microflora of unuberized roots of *Eucalyptus calophylla* R. Br. and *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm. seedlings grown in soils suppressive and conducive to *Phytophthora cinnamomi* Rands. II Mycorrhizal roots and associated microflora. *Aust. J. Bot.* 27: 255-272.
- Marx, D. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454.

- Mataré, R. et Hattingh, M.J. 1978. Effect of mycorrhizal status of avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. Plant Soil 49: 433-435.
- Mayo, K., Davis, R. et Motta, J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. Mycologia 78: 426-431.
- McAllister, C.B., Garcia Romera, I., Godeas, A. et Ocampo, J.A. 1994. *In vitro* interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*. Soil Biol. Biochem. 26: 1369-1374.
- McGraw, A.C. 1983. The influence of inoculum density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on their development and on Fusarium wilt of tomato. Thèse de PhD, Univ. of Florida.
- McGraw, A.C. et Schenck, N.C. 1981. Effects of two species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the development of Fusarium wilt of tomato. Phytopathology 71: 894.
- Meyer, J. et Dehne, H.-W. 1986. The influence of VA mycorrhizae on biotrophic leaf pathogens *Dans* Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon. Institut national de la recherche agronomique. pp. 781-786.
- Meyer, J.R. et Linderman, R.G. 1986a. Response of subterranean clover to dual inoculation with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting bacterium, *Pseudomonas putida*. Soil Biol Biochem 18: 185-190.
- Meyer, J.R. et Linderman, R.G. 1986b. Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. Soil Biol. Biochem. 18: 191-196.
- Millar-Wideman, M.A. et Watrud, L.S. 1984. Sporulation of *Gigaspora margarita* in root cultures of tomato. Can. J. Bot. 30: 642-646.
- Miller, J.C., Rajapakse, S. et Garber, R.K. 1986. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in vegetables crops. Hortscience 21: 974-984.

- Modjo, H.S. et Hendrix, J.W. 1986. The mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum* as a cause of tobacco stunt disease. *Phytopathology* 76: 688-691.
- Modjo, H.S., Hendrix, J.W. et Nesmith, W.C. 1987. Mycorrhizal fungi in relation to control of tobacco stunt disease with soil fumigants. *Soil Biol. Biochem.* 19: 289-295.
- Morandi, D., Bailey, J.A. et Gianinazzi-Pearson, V. 1984. Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant Pathol.* 24: 357-364.
- Morton, J.B. et Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporinae, with two new families, Acaulosporaceae, and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Mosse, B. 1962. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. Rothamsted Experimental Station Report for 1961. p. 80.
- Mosse, B. 1972. Growth of *Endogone* mycorrhiza in agar medium. Rothamsted Experimental Station Report for 1971. p. 93.
- Mosse, B. et Hepper, C.M. 1975. Vesicular-arbuscular infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 5: 215-223.
- Mugnier, J. et Mosse, B. 1987a. Spore germination and viability of a vesicular-arbuscular fungus *Glomus mosseae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88: 411-413.
- Mugnier, J. et Mosse, B. 1987b. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045-1050.
- Nair, M., Safir, G. et Siqueira, J. 1991. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 434-439.

- Nemec, S. 1979. *Fusarium oxysporum* wilt disease development in key lime infected with *Glomus etunicatus* Dans Proceedings of the 4th North American Conference on Mycorrhizae, Colorado Univ., Fort Collins.
- Nemec, S. et Myhre, D. 1984. Virus-*Glomus etunicatum* interactions in citrus rootstocks. Plant Dis. 68: 311-314.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. et Watkinson, A.R. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. J. Ecol. 82: 805-814.
- Newsham, K.K., Fitter, A.H. et Watkinson, A.R. 1995. Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. J. Ecol. 83: 991-1000.
- Niemira, B.A., Hammerschmidt, R. et Safir, G.R. 1996. Postharvest suppression of potato dry rot (*Fusarium sambucinum*) in prenuclear minitubers by arbuscular mycorrhizal fungal inoculum. American Potato Journal 73: 509-515.
- Nirenberg, H.I. 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* spp. occurring on wheat. Can. J. Bot. 59: 1599-1609.
- O'Bannon, J.H., Inserra, R.N., Nemec, S. et Vovlas, N. 1979. The influence of *Glomus mosseae* on *Tylenchulus semipenetrans* infected and uninfected *Citrus limon* seedlings. J. Nematol. 11: 217-250.
- O'Bannon, J.H. et Nemec, S. 1979. The response of *Citrus limon* seedlings to a symbiont, *Glomus etunicatus*, and a pathogen, *Radopholus similis*. J. Nematol. 11: 270-275.
- Ocampo, J.A., Martin, J. et Hayman, S.D. 1980. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infections. I. Host and non-host plants grown together. New Phytol. 84: 27-35.
- Oliveira, E., Sieverding, E. et Toro, S. 1987. Interaction between three species of VAM fungi and one isolate of *Pseudomonas putida* on cassava Dans 7th North American Conference on Mycorrhizae. *Édité par* D.M. Sylvia, L.L. Hung et J.H. Graham. Institute of Food and Agricultural Sciences, Univ. of Florida, Gainesville, FL. p. 216.

- Orolfo, E.B. 1990. Effect of the biological interactions between mycorrhiza and nematophagous fungi for the control of plant parasitic nematodes *Dans Innovation and integration*. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae, Jackson, WY. p. 229.
- Orozco, M.O., Fernandez, E., Prikryl, Z., Vancura, V. et Herrera, R.A. 1984. Observacionez del micelio extramatricio de las micorrizas vesiculo-arbusculares al microscopio electronico de barrido. *Acta Botanica Cubana* 20: 88-92.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54.
- Papavizas, G.C. et Lumsden, R.D. 1980. Biological control of soil borne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389-413.
- Paula, M., Siquira, J. et Doñbereiner, J. 1993. Ocorrência de fungos micorrizicos vesiculoarbusculares e de bactérias diazotroficas na cultura da batata-doce. *Rev. Bras. Ci. Solo, Campinas* 17: 349-356.
- Paulitz, T.C. et Linderman, R.G. 1989. Interactions between fluorescent pseudomonads and VA mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 113: 37-45.
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S. et Ryan, C.A. 1991. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.
- Perrin, R. 1985. L'aptitude des mycorrhizes à protéger les plantes contre les maladies: Panacée ou chimère? *Ann. Sci. For.* 42: 97-114.
- Perrin, R. 1990. Interactions between mycorrhizae and diseases caused by soil-borne fungi. *Soil Use Manage.* 6: 189-195.
- Perrin, R. 1991. Mycorrhizes et protection phytosanitaire *Dans Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Édité par D.G. Strullu. Technique et documentation - Lavoisier, Paris.* pp. 93-130.
- Phillips, J.M. 1971. The establishment of mycorrhizal infection under aseptic conditions. *Rothamsted Experimental Station Report for 1970.* p. 88.



- Pinochet, J., Calvet, C., Camprubi, A. et Fernandez, C. 1996. Interactions between migratory endoparasitic nematodes and arbuscular mycorrhizal fungi in perennial crops: A review. *Plant Soil* 185: 183-190.
- Pinochet, J., Camprubi, A. et Calvet, C. 1993. Effects of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulmus* and the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* on the growth of EMLA-26 apple rootstock. *Mycorrhiza* 4: 79-83.
- Pirozynski, K.D.M. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* 6: 153-164.
- Plank, C. O. 1992. Plant analysis reference procedures for the southern region of the United States. Southern cooperative series, College of Agricultural and Environmental Sciences, University of Georgia, Athens, Ga. Bull. 368.
- Plenchette, C., Declerck, S., Diop, T.A. et Strullu, D.G. 1996. Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot root. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 545-548.
- Posta, K., Marschner, H. et Römheld, V. 1994. Manganese reduction in the rhizosphere of mycorrhizal and nonmycorrhizal maize. *Mycorrhiza* 5: 119-124.
- Pozo, M.J., Dumas-Gaudot, E., Slezack, S., Cordier, C., Asselin, A., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V., Azcon-Aguilar, C. et Barea, J.M. 1996. Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. *Agronomie* 16: 689-697.
- Priestel, G. 1980. Wechselbeziehung zwischen der endotrophen mycorrhiza und dem wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 an Gurke. Thèse de PhD, Univ. Hannover.
- Ramaraj, B., Shanmugam, N. et Dwarakanath Reddy, A. 1988. Biocontrol of *Macrophomina* root rot of cowpea and *Fusarium* wilt of tomato by using VAM fungi *Dans* Proceedings of the 1st Asiatic Conference on Mycorrhizae. *Édité par* A. Mahadevan, N. Raman et K. Natarajan. Madras, India. pp. 250-251.

- Ramirez, B.N. 1974. Influence of endomycorrhizae on the relationship of inoculum density of *Phytophthora palmivora* in soil to infection of papaya roots. Thèse de MSc, Univ. Florida.
- Ravnskov, S., Jakobsen, I., Kragelund, L. et Nybroe, O. 1996. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on *Pseudomonas fluorescens* (DF57) in soils with and without roots *Dans* Proceedings of the First International Conference on Mycorrhizae, Berkeley, CA. *Édité par* M.T. Szaro et T.D. Bruns. pp. 100-101.
- Rempel, C.B. 1989. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) and fungal pathogens in wheat. Thèse de MSc, Univ. of Manitoba.
- Remy, W., Taylor, T.N., Hass, H. et Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11841-11843.
- Roncadori, R.W. et Hussey, R.S. 1977. Interaction of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* and root-knot nematode on cotton. *Phytopathology* 67: 1507-1511.
- Rosendahl, C. et Rosendahl, S. 1990. The role of vesicular-arbuscular mycorrhiza in controlling damping-off and growth reduction in cucumber caused by *Pythium ultimum*. *Symbiosis* 9: 363-366.
- Rosendahl, S. 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathol. Z.* 114: 31-40.
- Ross, J.P. 1972. Influence of Endogone mycorrhiza on Phytophthora rot of soybean. *Phytopathology* 62: 896-897.
- Safir, G. 1968. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the resistance of onion to *Pyrenochaeta terrestris*. Thèse de MSc, Univ. Illinois.
- Salem, F.M., Salem, M.A., Fawaz, K. et Michail, S.H. 1984. Studies on the interaction between certain mycorrhizal fungi and *Meloidogyne javanica* (Treub) (Nematoda) on root-knot severity and growth on broad bean-plants. *Anz. Schaedlingsk. D. Pflanzenschutz. Umweltschutz.* 57: 72-74.

- SAS Institute Inc. 1987. *SAS/STAT™ Guide for personal computers*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SAS Institute Inc. 1992. *The SAS System for Windows 3.10, release 6.08*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schenck, N.C., Kinloch, R.A. et Dickson, D.W. 1975. Interaction of endomycorrhizal fungi and root-knot nematode on soybean *Dans* Endomycorrhizas. *Édité par* F.E. Sanders, B. Mosse et P.B. Tinker. Academic Press, London. pp. 607-617.
- Schenck, N.C. et Kinlock, R.A. 1974. Pathogenic fungi, parasitic nematodes, and endomycorrhizal fungi associated with soybean roots in Florida. *Plant Dis. Rep.* 58: 169-173.
- Schenck, N.C., Ridings, W.H. et Cornell, J.A. 1977. Interaction of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Phytophthora parasitica* on two citrus root stocks *Dans* Proceedings of the 3rd North American Conference on Mycorrhizae, Corvallis, OR. p. 9.
- Schönbeck, F. 1979. Endomycorrhiza in relation to plant diseases *Dans* Soil-Borne Plant Pathogens. *Édité par* B. Schippers et W. Gams. Academic Press, London New York San Francisco, CA. pp. 271-280.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1977. Damage to mycorrhizal and non mycorrhizal cotton seedlings by *Thielaviopsis basicola*. *Plant Dis. Rep.* 61: 266-267.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1979. Untersuchungen zum Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf Pflanzenkrankheiten 4. Pilzliche Sproßparasiten, *Olpidium brassicae*, TMV. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 86: 103-112.
- Schönbeck, F. et Dehne, H.-W. 1981. Mycorrhiza and plant health. *Gesunde Pflanzen* 33: 186-190.
- Schönbeck, F. et Schinzer, U. 1972. Untersuchungen über den Einfluß der endotrophen Mykorrhiza auf die TMV-Läsionenbildung in *Nicotiana tabacum* L. var. *Xanthi*. *Phytopathol. Z.* 73: 78-80.

- Schönbeck, F. et Spengler, G. 1979. Nachweis von TMV in Mycorrhiza-haltigen Zellen der Tomate mit Hilfe der Immunofluoreszenz. *Phytopathol. Z.* 94: 84-86.
- Schwab, S.M., Menge, J.A. et Leonard, R.T. 1983. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudangrass roots in relation to vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol* 73: 761-765.
- Secilia, J. et Bagyaraj, D.J. 1987. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can. J. Microbiol.* 33: 1069-1073.
- Secilia, J. et Bagyaraj, D.J. 1988. Fungi associated with pot cultures of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90: 117-119.
- Sikora, R.A. 1979. Predisposition to *Meloidogyne* infection by the endotrophic mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* Dans Root-knot Nematodes (Meloidogyne species). Systematics, Biology and Control. *Édité par* F. Lamberti et C.E. Taylor. Academic Press, New York. pp. 399-404.
- Sikora, R.A. et Schönbeck, F. 1975. Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza (*Endogone mosseae*) on the population dynamics of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* Dans Proceedings of the VIII International Congress of Plant protection, Moscou. pp. 158-166.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R.C. et Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69.
- Singh, Y.P., Singh, R.S. et Sitaramaiah, K. 1990. Mechanism of resistance of mycorrhizal tomato against root-knot nematode Dans Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. *Édité par* B.L. Jalali et H. Chand. Hisar, India. pp. 96-97.
- Siqueira, J.O., Safir, G.R. et Nair, M.G. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytol.* 118: 87-93.

- Sivaprasad, P., Jacob, A., Nair, S.K. et George, B. 1990. Influence of VA mycorrhizal colonisation of root-knot nematode infestation in *Piper nigrum* L. Dans Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. Édité par B.L. Jalali et H. Chand. Hisar, India. pp. 100-101.
- Smith, G.S. 1988. The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374.
- Smith, G.S., Hussey, R.S. et Roncadori, R.W. 1986. Penetration and postinfection development of *Meloidogyne incognita* on cotton as affected by *Glomus intraradices* and phosphorus. *J. Nematol.* 18: 429-435.
- Smith, S.E. et Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 221-244.
- Smith, S.E. et Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd edition. Academic Press. San Diego, London.
- Spanu, P., Boller, T., Ludwig, A., Wiemken, A., Faccio, A. et Bonfante-Fasolo, P. 1989. Chitinases in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455.
- Spanu, P. et Bonfante-Fasolo, P. 1988. Cell-wall bound peroxydase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. *New Phytol* 109: 119-124.
- Stack, P.J., C.M. Kenerley, C.M. et Petit, R.E. 1988. Application of biological control agents Dans *Biocontrol of plant diseases*. Édité par K.G. Mukerji et K.L. Garg. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. pp. 43-54.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, F. et Fortin, J.A. 1993a. Interaction between an arbuscular mycorrhizal fungus and *Pythium* in pot grown *Tagetes patula* Dans 6th International Congress of Plant Pathology, Montréal, Qc. p. 299.

- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1993b. Direct *in vitro* mycelial interaction between an arbuscular mycorrhizal fungus growing on *Daucus carota* transformed roots, and *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* Dans Proceedings of the Ninth North American Conference on Mycorrhizae, Guelph, Ont. p. 137.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1994a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels Dans Colloque *Les symbioses mycorrhiziennes* (Mycorhizes 94), 62<sup>e</sup> Congrès de l'ACFAS, Université du Québec à Montréal, Montréal, Qc.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1994b. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. Can. J. Plant Pathol. 16: 187-194.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. et Fortin, J.A. 1995a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels Dans La symbiose mycorrhizienne - État des connaissances. Édité par J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché. Éditions Orbis Publishing, Frelighsburg, Qc. pp. 51-87.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1995b. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. Mycorrhiza 5: 431-438.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1996a. Co-culture with mycorrhizal *Tagetes patula* inhibited *Fusarium* wilt in the non-mycorrhizal host *Dianthus caryophyllus* as well as the pathogen in the soil Dans Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae, Berkeley, Cal. Édité par T.M. Szaro et T.D. Bruns. p. 112.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1996b. Enhanced hyphal and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. Mycological Research 100: 328-332.

- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. et Fortin, J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the nonVAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* 75: 998-1005.
- Stewart, E.L. et Pflieger, F.L. 1977. Development of poinsettia as influenced by endomycorrhizae, fertilizer and root rot pathogens *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*. *Florist's Review* 159: 37-79.
- Strullu, D.-G. et Plenchette, C. 1990. Encapsulation de la forme intraracinaire de *Glomus* dans l'alginate et utilisation des capsules comme inoculum. *C. R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie* 310: 447-452.
- Strzelczyk, E. et Pokojaska-Burdziej, A. 1984. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus sylvestris* L.) in dioxenic cultures with bacteria in media of different composition. *Plant Soil* 81: 185-194.
- STSC Inc. 1988. *Statgraphics user's guide*. STSC Inc., Rockville. p. 886.
- Subhashini, D.V. 1990. The role of VA mycorrhiza in controlling certain root diseases of tobacco *Dans* Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza. *Édité par* B.L. Jalali et H. Chand. Hisar, India. p. 102.
- Sundaresan, P., Raja, N.U. et Gunasekaran, P. 1993. Induction and accumulation of phytoalexins in cowpea roots infected with a mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and their resistance to fusarium wilt disease. *J. Biosci. (Bangalore)* 18: 291-301.
- Sutton, J.C. et Sheppard, B.R. 1976. Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 54: 326-333.
- Sylvia, D.M. et Hubbell, D.H. 1986. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259-267.
- Sylvia, D.M. et Sinclair, W.A. 1981. A proposed role for low level antibiotic activity of an ectomycorrhizal fungus. *Phytopathology* 71: 260.

- Taylor, T.N. 1990. Fungal associations in the terrestrial paleoecosystem. *Tree* 5: 21-25.
- Taylor, T.N., Remy, W., Hass, H. et Kerp, H. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560-573.
- Tester, M., Smith, S.E. et Smith, F.A. 1987. The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Can. J. Bot.* 65: 419-431.
- Thomas, R.S., Franson, R.L. et Bethlenfalvay, G.J. 1993. Separation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and root effects on soil aggregation. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 57: 77-81.
- Thompson, J.P. et Wildermuth, G.B. 1989. Colonization of crop and pasture species with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and a negative correlation with root infection by *Bipolaris sorokiniana*. *Can. J. Bot.* 69: 687-693.
- Thomson-Cason, K.M., Hussey, R.S. et Roncadori, R.W. 1983. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus with *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* 15: 410-417.
- Tisdall, J. et Oades, J. 1979. Stabilization of soil aggregates by the root systems of rygrass. *Aust. J. Soil Res.* 17: 429-441.
- Tosi, L., Giovannetti, M., Zizzerini, A. et Della Torre, G. 1988. Influence of mycorrhizal tobacco roots, incorporated into the soil, on the development of *Thielaviopsis basicola*. *Phytopathology* 122: 186-189.
- Traquair, J.A. et Pohlman, D.L. 1990. Endomycorrhizal biocontrol of *Cylindrocarpum* root rot of peach trees in field soil *Dans Innovation and integration. Proceedings of the 8th North American Conference on Mycorrhizae*, Jackson, WY. p. 288.
- Trotta, A., Varese, G.C., Gnani, E., Fusconi, A., Sampo, S. et Berta, G. 1996. Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil* 185: 199-209.



- Tsai, S. et Phillips, D. 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1485-1488.
- Tsantrizos, Y.S., Kope, H.H., Fortin, J.A. et Ogilvie, K.K. 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30: 1113-1118.
- Umesh, K.C., Krishnappa, K. et Bagyaraj, D.J. 1988. Interaction of burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne 1949, and VA mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* (Thaxt). Gerd and Trappe in banana (*Musa acuminata* Colla.). *Indian J. Nematol.* 18: 6-11.
- van Peer, R., Niemann, G.J. et Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Vancura, V., Orozco, M.O., Grauova, O. et Prikry, Z. 1989. Properties of bacteria in the hyphosphere of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 421-427.
- Vierheilig, H., Alt, M., Mader, P., Boller, T. et Wiemken, A. 1995. Spreading of *Glomus mosseae*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, across the rhizosphere of host and non-host plants. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1113-1115.
- Vierheilig, H., Alt, M., Mohr, U., Boller, T. et Wiemken, A. 1994. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and beta-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.* 143: 337-343.
- Villegas, J., Williams, R.D., Nantais, L., Archambeault, J. et Fortin, J.A. 1996. Effects on N source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system. *Mycorrhiza* 6: 247-251.

- Vimard, B., St-Arnaud, M., Furlan, V. et Fortin, J.A. 1996. *In vitro* monoxenic spores of *Glomus intraradices* used to produce endomycorrhizal plants: a solution to potentially contaminated inoculum *Dans* Abstracts of the First International Conference on Mycorrhizae, Berkeley, CA. pp. 122-123.
- Volpin, H., Elkind, Y., Okon, Y. et Kapulnik, Y. 1994. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. *Plant Physiol.* 104: 683-689.
- Volpin, H., Phillips, D.A., Okon, Y. et Kapulnik, Y. 1995. Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol.* 108: 1449-1454.
- Wacker, T.L., Safir, G.R. et Stephens, C.T. 1990. Effect of *Glomus fasciculatum* on the growth of asparagus and the incidence of Fusarium root rot. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115: 550-554.
- Whatley, T.L. et Gerdemann, J.W. 1981. The effect of *Glomus etunicatus* and soil phosphorus on Phytophthora root rot of soybean. *Phytopathology* 71: 912.
- Wyss, P., Boller, T. et Wiemken, A. 1989. Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29: 451-456.
- Wyss, P., Boller, T. et Wiemken, A. 1992. Testing the effect of biological control agents on the formation of vesicular arbuscular mycorrhiza. *Plant Soil* 147: 159-162.
- Zak, B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 2: 377-392.
- Zambolim, L. et Schenck, N.C. 1981. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhiza and root-rot infecting fungi on soybean. *Phytopathology* 71: 267.
- Zambolim, L. et Schenck, N.C. 1983. Reduction of the effects of pathogenic root-infecting fungi on soybean by mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*. *Phytopathology* 73: 1402-1405.