

2m11.2701.4

Université de Montréal

**Induction des mécanismes de résistance chez des plantules de carottes,
Daucus carota, colonisées par un champignon endomycorhizien
arbusculaire (*Glomus intraradices*) et infectées par le *Pythium ultimum*.**

Par

Brigitte Vimard

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en Sciences biologiques

avril 1999

© Brigitte Vimard, 1999



7-1075-1108

QK
3
U54
1999
V.002

Université de Montréal

Induction des mécanismes de résistance chez des plantes de carottes,
Daucus carota, colonisées par un champignon endomycorhizien
arbusculaire (Glomus intraradicea) et infectées par le Phytophthora ultimum.

Par
Édith Vézina
Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences (M. Sc.)
en Sciences biologiques



SEP 1999
Édith Vézina, 1999

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Induction des mécanismes de résistance chez des plantules de carottes,
Daucus carota, colonisées par un champignon mycorhizien arbusculaire et
infectées par le *Pythium ultimum*

présenté par

Brigitte Vimard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

| | |
|------------------------|------------------------|
| Président du jury | Dr Peterjürgen Neumann |
| Directeur de recherche | Dr J. André Fortin |
| Codirecteur | Dr Marc St-Arnaud |
| Membre du jury | Dr Chantal Hamel |

Mémoire accepté le 27 juillet 1999

SOMMAIRE

Les champignons endomycorhiziens à arbuscules (EA) permettent aux plantes avec lesquelles ils sont en association de mieux tolérer l'agression des champignons parasites des racines. Nos connaissances sur les mécanismes qui régissent cette protection restent encore fragmentaires. Il a été suggéré que le champignon EA induise chez son hôte un déploiement des mécanismes de défense, permettant ainsi aux plantes endomycorhizées une tolérance accrue aux maladies fongiques racinaires. Les changements physiologiques que subissent les plantes lors de l'endomycorhization, tel une augmentation des concentrations de phénylalanine, un acide aminé qui joue un rôle clé dans la synthèse de phénols, appuie cette hypothèse.

Ce travail a comme objectif de vérifier si le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* induit des mécanismes de défense chez la plante hôte *Daucus carota* lors d'une infection par le *Pythium ultimum*. Pour atteindre cet objectif il a fallu diviser cette étude en trois sections ; 1) mise au point d'une méthode pour produire des plantules de carottes colonisées uniquement par le champignon EA à l'étude, 2) essais de méthodes d'infection du pathogène pour obtenir une présence uniforme dans les racines de plantules de carottes, quelques jours seulement après l'inoculation, 3) caractérisation des changements induits dans les racines colonisées par le champignon EA et infectées par le champignon pathogène, à l'aide de la microscopie électronique à transmission couplée à l'utilisation de marqueurs à l'or colloïdal-enzymes.

Premièrement, il fut démontré que des spores de *Glomus intraradices* produites *in vitro* constituaient un inoculum aussi infectieux que l'inoculum de segments de racines endomycorhizés (conventionnel) pour coloniser des racines de poireaux, si le substrat utilisé était composé à part égale de sol minéral, de montmorillonite calciné (Turface), de tourbe (ProMix) et de Perlite. De plus les problèmes de contaminations fongiques observés dans les racines des plantes

hôtes colonisées à l'aide d'inoculum conventionnel furent pratiquement inexistantes avec l'inoculum de spores produites *in vitro*.

Il fut aussi établi que de semer des carottes en co-culture avec des poireaux endomycorhizés par des spores produites *in vitro* produisait des plantules de carottes possédant une colonisation endomycorhizienne élevée et uniforme du *G. intraradices*. Ce matériel étant nécessaire pour nos investigations ultérieures.

Deuxièmement, il fut démontré que l'application d'une pastille de gélose recouverte de *P. ultimum* en pleine croissance, déposée directement sur le système racinaire des plantules de carottes, produisait une infection uniforme dans les racines de ces dernières quelques jours seulement après l'inoculation.

Troisièmement, une désorganisation cytoplasmique des hyphes du *Pythium* fut observée à plusieurs reprises dans les racines colonisées préalablement par *G. intraradices*. À une occasion, la présence d'une apposition pariétale fût observée au point de pénétration du *P. ultimum*. Ces changements morphologiques et physiologiques dans les racines de carottes endomycorhizées, 24 heures seulement après l'inoculation du champignon pathogène suggèrent que le *G. intraradices*, lors de la colonisation de son hôte, élicite l'induction de mécanismes de défense.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------------|
| SOMMAIRE..... | iii |
| TABLE DES MATIÈRE..... | v |
| LISTE DES TABLEAUX..... | viii |
| LISTE DES FIGURES..... | x |
| LISTE DES ABBRÉVIATIONS..... | xii |
| REMERCIEMENTS..... | xiii |
| INTRODUCTION GÉNÉRALE..... | 1 |
| 1.La symbiose mycorhizienne..... | 1 |
| 2.Étapes du développement des endomycorhizes arbusculaires..... | 3 |
| 3.Avantages de cette symbiose..... | 4 |
| 4.Diminution des maladies racinaires et de leur sévérité..... | 5 |
| 5.Hypothèses émises pour expliquer cette protection..... | 6 |
| 5.1 Nutrition améliorée..... | 6 |
| 5.2 Modification de la microflore..... | 7 |
| 5.3 Stimulation des mécanismes de résistance de la plante..... | 8 |
| 6.Mécanismes de défense des plantes..... | 10 |
| 7.Éliciteurs du potentiel naturel de défense des plantes..... | 12 |
| 8.Projet de maîtrise..... | 13 |
| CHAPITRE 1 : COLONIZATION POTENTIAL OF <i>IN VITRO</i>-PRODUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS SPORES AS COMPARED WITH ENDOMYCORRHIZAL ROOT SEGMENT INOCULUM FROM OPEN POT CULTURE..... | 14 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| INTRODUCTION..... | 16 |
| MATERIALS AND METHODS..... | 17 |
| Source of inoculum..... | 17 |
| Spores viability..... | 18 |
| Leek seedlings preparation..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| Effect of growth substrate and inoculum type on AM colonization of leek seedlings..... | 19 |
| Effect of spore age on the rate of colonization of leek seedlings..... | 20 |
| Colonization of carrot seedlings in co-culture with AM leek plants... | 20 |
| Statistical analyses..... | 21 |
| RESULTS..... | 22 |
| Effect of substrate, inoculum type and spore age on AM colonization of leek seedlings..... | 22 |
| Colonization of carrot seedlings in co-culture with AM leek plants.. | 22 |
| DISCUSSION..... | 23 |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | 27 |
| REFERENCES..... | 28 |
| TABLES..... | 33 |
| FIGURES..... | 37 |
| CHAPITRE 2 : SÉLECTION DE L'ISOLAT DE <i>PYTHIUM</i> ET DE LA MÉTHODE D'INOCULATION..... | 39 |
| INTRODUCTION..... | 39 |
| MATERIEL ET MÉTHODE..... | 41 |
| Inoculation avec une suspension mycélienne..... | 41 |
| Inoculation avec un substrat infesté..... | 43 |
| Inoculation avec une pastille de gélose..... | 44 |
| <i>Première essai.....</i> | 44 |
| <i>Deuxième essai.....</i> | 44 |
| RÉSULTATS..... | 45 |
| DISCUSSION..... | 45 |
| CONCLUSION..... | 48 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 49 |
| TABLEAUX..... | 51 |
| CHAPITRE 3 : RÔLE DU <i>GLOMUS INTRARADICES</i> DANS LA PROTECTION DES PLANTULES DE CAROTTES CONTRE LE <i>PYTHIUM ULTIMUM</i>..... | 55 |

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 55 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODE..... | 57 |
| Préparation des pots mères..... | 57 |
| Colonisation des plantules de carottes par <i>G. intraradices</i> | 58 |
| Inoculation des plantules de carottes par le <i>P. ultimum</i> | 58 |
| Prélèvement des échantillons et préparation des tissus pour la microscopie électronique à transmission (MET)..... | 59 |
| Préparation des coupes..... | 60 |
| Marquage cytochimique à l'or colloïdal..... | 60 |
| RÉSULTATS..... | 61 |
| Colonisation mycorhizienne et infection par le champignon pathogène..... | 61 |
| Observations ultrastructurales..... | 61 |
| DISCUSSION..... | 62 |
| CONCLUSION..... | 66 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 67 |
| TABLEAU..... | 71 |
| FIGURES..... | 72 |
| DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 75 |
| 1. Modifications apportées aux méthodes conventionnelles pour produire des plantules de carottes colonisées par un champignon EA..... | 75 |
| 2. Essais d'infection du <i>P. ultimum</i> | 77 |
| 3. Observations au MET..... | 79 |
| CONCLUSION..... | 80 |
| BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE..... | 82 |
| ANNEXE 1..... | 97 |
| ANNEXE 2..... | 98 |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : COLONIZATION POTENTIAL OF *IN VITRO*-PRODUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS SPORES AS COMPARED WITH ENDOMYCORRHIZAL ROOT SEGMENT INOCULUM FROM OPEN POT CULTURE

| | | |
|----------|--|----|
| Table 1. | Effect of substrate and inoculum type on the percentage of root colonization of leek seedlings by <i>G. intraradices</i> | 33 |
| Table 2. | Effect of substrate and inoculum type on the percentage of root colonization of leek seedlings by unidentified contaminant fungi..... | 34 |
| Table 3. | Effect of the age of the <i>in vitro</i> <i>G. intraradices</i> cultures from which the spores were extracted on the AM colonization of leek roots after 12 weeks in pot culture..... | 35 |
| Table 4. | Percentage of root length of carrot seedlings harboring external hyphae, appressoria, internal hyphae, arbuscules, and vesicles of <i>G. intraradices</i> during a 14-day period after seedling emergence..... | 36 |

CHAPITRE 2 : SÉLECTION DE L'ISOLAT DE *PYTHIUM* ET DE LA MÉTHODE D'INFECTION

| | | |
|------------|---|----|
| Tableau 1. | Effet de la concentration en propagules de la suspension mycélienne de trois isolats de <i>Pythium</i> sp. sur le pourcentage de nécroses racinaires de plantules de carottes cv Caro-choice en fonction du temps d'incubation..... | 51 |
|------------|---|----|

| | | |
|--|--|----|
| Tableau 2. | Pourcentage de la longueur racinaire de quatre cultivars de carottes infectées par le <i>P. ultimum</i> N1 inoculé sous forme de sol infesté..... | 52 |
| Tableau 3. | Effet de l'inoculation sous forme de pastille de gélose de trois isolats de <i>Pythium</i> sp. sur le pourcentage de mortalité des plantules de quatre cultivars de carottes après six jours d'incubation..... | 53 |
| Tableau 4. | Pourcentage de la longueur du système racinaire de plantules de carottes cv Caro-choice infectées par le <i>P. ultimum</i> N1 inoculé sous forme de pastilles de gélose en fonction du temps d'incubation..... | 54 |
| CHAPITRE 3 : RÔLE DU <i>GLOMUS INTRARADICES</i> DANS LA PROTECTION DES PLANTULES DE CAROTTES CONTRE LE <i>PYTHIUM ULTIMUM</i> | | |
| Tableau 1. | Colonisation par le <i>G. intraradices</i> et le <i>P. ultimum</i> des systèmes racinaires de plantules de carottes prélevés pour observation au MET..... | 71 |

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : COLONIZATION POTENTIAL OF *IN VITRO*-PRODUCED ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS SPORES AS COMPARED WITH ENDOMYCORRHIZAL ROOT SEGMENT INOCULUM FROM OPEN POT CULTURE

- Figure 1a. Leek root inoculated with *in vitro*-produced AM spores, showing vesicles of *G. intraradices*.....38
- Figure 1b. Leek root inoculated with AM root segments and colonized soil, showing vesicles of *G. intraradices*, and revealing the abundant presence of unidentified contaminant fungi in the epidermal cells.....38
- Figure 1c-e. Different AM structures present during the colonization of the root of carrot seedlings grown in co-culture with AM leek plants.....38

CHAPITRE 3 : RÔLE DU *GLOMUS INTRARADICES* DANS LA PROTECTION DES PLANTULES DE CAROTTES CONTRE LE *PYTHIUM ULTIMUM*

- Figure 1a-d. Coupes transversales d'une racine de carotte colonisée par le *G. intraradices* et infectée par le *P. ultimum*. a,b, Hyphes du *P. ultimum* et arbuscules du *G. intraradices* contiguës dans la même cellule. c,d Hyphe du *P. ultimum* possédant des vacuoles hypertrophiées et dont le plasmalemme est rétracté.....73

Figure 2a-d. Coupe transversale d'une racine de carotte colonisée par le *G. intraradices* et infecté par le *P. ultimum*. a, Hyphe du *P. ultimum* à l'état de coquille pleiomorphique. b, Apposition pariétale au niveau de la membrane cytoplasmique de l'hôte dans une zone de pénétration d'une hyphe du *Pythium ultimum*. c, Hyphe du *G. intraradices* mycoparasitée par deux hyphes du *P. ultimum*. d, Pénétration d'une cellule de l'hôte par une hyphe du *P. ultimum*.....74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | | | |
|--------------|--|-----------------|---|
| ADN | acide désoxyribonucléique | PEG | polyéthylène glycol |
| AM | arbuscular mycorrhiza | PI | plasmalemme |
| AMF | arbuscular mycorrhizal fungi | p/p | poids/poids |
| ANOVA | analysis of variance | p/v | poids/volume |
| Ap | apposition pariétale, ou appressoria | Pu | Pythium ultimum |
| Ar | arbuscule | Ri T-DNA | root inducing transformed desoxyribonucleic acid |
| ARNm | acide ribonucléique messager | rpm | rotation par minute |
| CaCO | cacodylate de calcium | SEM | standard error of the means |
| CFU | colony forming unit | TLC | thin layer chromatography |
| CHI | chalcone isomérase | UCF | unidentified contaminant fungi |
| CHS | chalcone synthase | V | vesicle |
| cm | centimètre ou centimeter | Va | vacuole |
| Cp | coquille pleiomorphique | wt | weight |
| Cu | cuivre | Zn | zinc |
| cv. | Cultivar | µm | micromètre, micrometer |
| DAOM | Department of Agriculture Ottawa Mycology | | |
| EA | endomycorhizien à arbuscule | | |
| Eh | external hyphae | | |
| ET | erreur type | | |
| g | gramme | | |
| G. | <i>Glomus</i> | | |
| Gi | <i>Glomus intraradices</i> | | |
| HPLC | high performance liquid chromatography | | |
| HRGPs | hydroxyproline rich glycoproteins | | |
| lh | internal hyphae | | |
| Kg/ha | kilogramme/hectare | | |
| KOH | hydroxyde de potassium | | |
| Kv | Kilovolt | | |
| l | liter | | |
| L | litre | | |
| M | molaire | | |
| MET | microscope électronique à transmission | | |
| MCH | membrane cytoplasmique de l'hôte | | |
| ml | millilitre ou milliliter | | |
| mm | millimètre ou millimeter | | |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide | | |
| nm | nanomètre | | |
| P | phosphore | | |
| P | probability level | | |
| P. | <i>Pythium</i> | | |
| PAL | phenylalanine ammonia-lyase | | |
| PAR | photosynthetically active radiation | | |
| PBS | phosphate buffered saline | | |
| PDA | potato dextrose agar | | |
| PDB | potato dextrose broth | | |

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr J. André Fortin qui m'a permis, après plusieurs années de collaboration, d'entreprendre un projet de mon choix. Ses conseils toujours pertinents et son aide financière ont facilité les années nécessaires à l'exécution de ce mémoire. Je tiens également à exprimer toute ma gratitude à mes deux codirecteurs, le Dr Marc St-Arnaud et le Dr Nicole Benhamou. Leur dynamisme et leur avidité à communiquer leurs connaissances scientifiques m'ont permis d'acquérir l'information nécessaire pour compléter ce projet. Je remercie également le Dr Valentin Furlan de la station de recherche d'Agriculture et d'Agroalimentaire Canada à Ste-Foy pour nous avoir fourni l'inoculum de racines de poireaux colonisées par le *Glomus intraradices* ainsi que le sol utilisé pour la préparation du substrat ; le Dr Z.K. Punja, Department of Biological Sciences, Simon Fraser University pour les isolats de *Pythium violae*; enfin le Dr T.C. Paulitz, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'environnement, Université McGill pour l'isolat de *Pythium ultimum* N1.

Je ne voudrais pas passer sous silence l'aide apportée par toute l'équipe du personnel de l'IRBV, Lucie Campeau, Lucie Dubé, Claude Lafleur, Lorraine Lambert, Nicole Taillefer et M. Verdon. Plusieurs collègues méritent également ma reconnaissance. Denis Lauzer et Stéphane Daigle pour leur aide technique. Les botanistes du Jardin botanique avec qui j'ai passé des moments agréables. Les étudiants gradués avec lesquels j'ai partagé des discussions enrichissantes ainsi que des périodes de découragements. Finalement, je voudrais remercier Linda Dumont que j'ai appris à connaître durant ces quelques années et qui s'est avérée une bonne amie.

Enfin un dernier merci à mon conjoint Michel et mes trois enfants Cédric, Ariel et Sarah qui m'ont aidé à comprendre où sont les vraies priorités et à qui je laisse cette pensée : «To achieve any significant goal you must leave your comfort zone».

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Que ce soit en horticulture ou en agriculture, les maladies des plantes constituent indéniablement un fléau. Traditionnellement, ces maladies ont été réprimées avec plus ou moins de succès à l'aide de pesticides chimiques. Or, il existe aujourd'hui une forte tendance vers la réduction de l'usage de ces substances. Diverses raisons motivent ce changement, tels les problèmes de toxicité liés à leur usage et l'apparition de la résistance aux pesticides chez plusieurs organismes pathogènes. La lutte biologique s'impose comme un outil essentiel pour diminuer la dépendance à l'égard des pesticides chimiques.

L'action des micro-organismes utilisés en lutte biologique se situe à trois niveaux : 1) la réduction des populations de l'agent pathogène par l'introduction de micro-organismes antagonistes qui détruisent l'agent pathogène, réduisent sa vigueur ou interrompent sa formation, 2) la protection de la plante à sa surface par des micro-organismes qui agissent comme barrière biologique par leurs actions compétitives, antibiotiques ou parasites, 3) la protection interne, par l'établissement de micro-organismes non-pathogènes pour stimuler la résistance de la plante ou pour simplement occuper le site (Cook 1982). Les champignons mycorhiziens, qui représentent un groupe important d'organismes symbiotiques, jouent un rôle prépondérant comme agents de lutte biologique contre les micro-organismes pathogènes des racines (Caron 1989) .

1. La symbiose mycorhizienne

Le champignon mycorhizien est l'un des partenaires de l'association constituée par la symbiose mycorhizienne. Plusieurs types de symbioses mycorhiziennes existent, les endomycorhizes arbusculaires, les ectomycorhizes, les ectendomycorhizes, les mycorhizes arbutoïdes, les mycorhizes des monotropes, les mycorhizes des éricacées et finalement les mycorhizes des orchidées (Smith et Read 1997).

Le présent travail traite spécifiquement de la symbiose endomycorhizienne arbusculaire (EA), qui est définie comme une association généralement mutualiste entre les racines des végétaux et le mycélium de champignons édaphiques de l'ordre des Glomales. Par cette relation, la plante peut avoir un meilleur accès à des sources de minéraux (P, Zn, Cu) souvent présents en quantité limitative dans le sol. En retour, l'activité photosynthétique de la plante procure au champignon les hydrates de carbone essentiels à son développement.

La symbiose EA existe probablement depuis plus de 400 millions d'années (Remy *et al.* 1994; Simon *et al.* 1993) et elle aurait permis la colonisation des habitats terrestres par les premières plantes ainsi que leur dissémination dans la plupart des biotopes (Le Tacon et Selosse 1994; Pironzynski et Malloch 1975). Elle est présentement la plus fréquente des symbioses mycorhiziennes que l'on retrouve dans le sol.

L'identification de ces champignons microscopiques est difficile, ce qui rend leur classification problématique. Par le passé, les champignons endomycorhiziens étaient classés selon la morphologie des spores. Les classifications plus récentes utilisent des caractères d'importance phylogénétique comme c'est le cas avec la classification de Morton et Benny (1990). En se basant sur ces nouvelles informations, les endosymbiotes sont classés dans l'ordre des Glomales que l'on divise en deux sous-ordres, soit les Glomineae et les Gigasporineae, selon que les espèces possèdent ou non des vésicules. Actuellement, on compte approximativement 150 espèces de champignons EA (Walker et Trappe 1993) dont la description est souvent insatisfaisante (Smith et Read 1997). L'utilisation plus fréquente de séquençage d'ADN dans le futur permettra de mieux différencier les variations inter- et intraspécifiques, ce qui aura pour effet d'améliorer la classification actuelle.

La gamme des végétaux qui présentent une symbiose EA est très vaste. On retrouve cette symbiose autant chez les angiospermes que chez les gymnospermes, les fougères, les ptéridophytes et les bryophytes. Environ 95% des plantes connues appartiennent à des familles typiquement mycorhiziennes

(Smith et Read 1997). Même chez des familles de plantes considérées comme habituellement exemptes d'associations mycorhiziennes telles les Juncaceae, les Polygonaceae, les Cruciféraceae et les Caryophyllaceae, il est possible à l'occasion de retrouver une colonisation mycorhizienne (Tester *et al.* 1987).

Contrairement aux symbioses rhizobiennes, les symbioses EA ne sont pas spécifiques, c'est-à-dire qu'une espèce de champignon mycorhizien peut coloniser plusieurs espèces de plantes hôtes et que de façon similaire une plante hôte peut être associée à plusieurs espèces de champignons mycorhiziens. Il faut toutefois noter que selon les espèces impliquées dans l'association, le niveau de colonisation ainsi que l'efficacité de la relation pourra varier (Giovannetti et Hepper 1985; Peterson et Bradbury 1995; Smith *et al.* 1992).

2. Étapes du développement des endomycorhizes arbusculaires

La colonisation de la plante hôte et l'établissement de la symbiose se produisent lorsqu'une hyphe entre en contact avec une racine. Cette hyphe peut provenir soit de la germination d'une spore ou d'une vésicule, soit d'un réseau d'hyphes extramatricielle déjà établi dans le sol. Rapidement, il y a formation d'un appressorium au niveau d'une cellule épidermale et pénétration. La pénétration de l'hyphe se fait soit de façon mécanique (Holley et Peterson 1979), soit par l'action d'enzymes comme les pectinases (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1981). Par la suite, les hyphes se propagent de façon intra- ou extracellulaire au niveau du cortex, sans atteindre la stèle. A l'intérieur des cellules corticales, les hyphes se ramifient pour former des arbuscules qui n'ont qu'une durée de vie de quelques jours. Par contre, l'hyphe d'où provenait cet arbuscule continue sa progression et forme de nouvelles arbuscules dans d'autres cellules parenchymateuses du cortex. Dans les cellules corticales où les arbuscules se développent, le plasmalemme s'allonge pour enrober chacune des branches de ce dernier, permettant un contact privilégié entre les deux symbiotes. L'arbuscule n'est cependant pas le seul site d'échanges nutritionnels; selon Smith *et al.* (1994), les

hyphes intercellulaires joueraient aussi un rôle dans le transfert bidirectionnel des nutriments.

Dans les régions de la racine où la colonisation est plus ancienne, des vésicules peuvent se former. La formation de ces structures est fortement contrôlée par les conditions environnementales (Smith et Read 1997). Les vésicules possèdent des parois épaisses et sont constituées en grande partie de lipides et de noyaux cellulaires. Ces caractéristiques leur confèrent un rôle privilégié en tant que structure de réserve et pouvant servir à la propagation. Cette structure ne se retrouve pas chez toutes les espèces de champignons endomycorhiziens.

Lorsque la colonisation est bien établie à l'intérieur de la racine, un réseau de mycélium extramatriciel se forme. Ces hyphes externes s'étendent à de grandes distances et des spores, propagules externes, sont produites.

3. Avantages de cette symbiose

La recherche dans le domaine des endomycorhizes arbusculaires a pris son essor dans les années soixante. Durant cette période, on a surtout cherché à mieux comprendre le fonctionnement de cette symbiose ainsi que l'avantage nutritionnel qu'elle confère à la plante hôte. Depuis les années quatre-vingt, davantage de chercheurs se sont intéressés aux endomycorhizes et leurs travaux ont permis de mettre en évidence les autres bénéfices conférés par cette symbiose.

On sait maintenant qu'en plus d'améliorer la nutrition de la plante, les champignons endomycorhiziens permettent à celle-ci de mieux tolérer la sécheresse. On explique cette plus grande tolérance à la sécheresse par la présence d'un système racinaire mieux développé, connecté à un réseau d'hyphes extramatricielles leur permettant d'explorer un plus grand volume de sol et ainsi d'améliorer leur extraction de l'eau disponible (Smith et Read 1997).

Un autre avantage indéniable de la présence d'un réseau d'hyphes extramatricielles dans le sol est relié au rôle qu'il joue dans la formation

d'agrégats, lesquels améliorent la structure et la stabilité des ces sols (Andrade *et al.* 1998, Miller et Jastrow 1992; Tisdale et Oades 1982).

Finalement, il a été observé à maintes reprises que les plantes colonisées par un champignon EA résistaient mieux à une attaque par un agent pathogène tellurique (Dehne 1982; St-Arnaud *et al.* 1995a).

4. Diminution des maladies racinaires et de leur sévérité

Depuis les premières observations sur la diminution de la sévérité des maladies chez les plantes colonisées par un champignon EA, beaucoup d'auteurs se sont intéressés aux interactions entre les champignons EA et les micro-organismes pathogènes des plantes hôtes. Ces travaux sont difficilement comparables car les systèmes expérimentaux utilisés sont hétéroclites. Néanmoins, certaines généralités peuvent être dégagées à partir de ces observations. La majorité des études portant sur les maladies causées aux parties aériennes de la plantes ont montré que la colonisation par un champignon endomycorhizien augmentait les symptômes (Davis *et al.* 1979; Meyer et Dehne 1986; Rempel 1989; Schönbeck et Dehne 1979).

Par contre, les maladies racinaires sont contrôlées par la colonisation endomycorhizienne et ce, quel que soit le type de micro-organisme en cause. Garcia-Garrido et Ocampo (1988, 1989) ont confronté le *G. mosseae* avec deux espèces de bactéries de la tomate, les *Erwinia carotovora* cv *carotovora* et *Pseudomonas syringae*. Dans les deux cas, ils ont observé une diminution de la population bactérienne dans la rhizosphère. La même tendance est observée pour les maladies causées par les nématodes (Calvet *et al.* 1995; Hussey et Roncadori 1982) et les champignons pathogènes (Datnoff *et al.* 1995; Krisna et Bagyaraj 1982; Norman 1996; St-Arnaud *et al.* 1994; Trotta *et al.* 1996; Zambolin et Schenck 1983). En général la colonisation par un champignon EA diminue la sévérité de ces maladies. Par contre, les maladies causées par les agents viraux induisent des réponses variables lorsque les plantes hôtes sont colonisées par un champignon EA. Schönbeck et Dehne (1979) voient les symptômes augmentés

dans les plants de tabac colonisés par le *Glomus mosseae* et attaqués par le virus de la mosaïque du tabac tandis que Nemeč et Myhre (1984) ne rapportent aucun changement au niveau des symptômes causés par le virus de la Tristeza chez des plants de citrons colonisés par le *Glomus etunicatum*. A ce jour, aucun effet protecteur du champignon endomycorhizien n'a été rapporté pour une maladie virale.

A la lumière de tous ces travaux, il est maintenant reconnu que les champignons EA jouent un rôle important, non seulement en améliorant la nutrition des plants hôtes, mais aussi en diminuant la sévérité des maladies racinaires.

5. Hypothèses émises pour expliquer cette protection

5.1 Nutrition améliorée

Un des mécanismes le plus souvent invoqué pour expliquer l'effet de l'association endomycorhizienne sur les relations plantes-parasites concerne l'amélioration de la nutrition phosphatée (Davis et Menge 1980; Graham et Menge 1982; Smith 1988). Ces travaux suggèrent que la substitution par un engrais phosphaté produit la même réponse sur l'hôte que la colonisation endomycorhizienne et que l'incidence des dégâts est compensée par un volume racinaire accru (Pinochet *et al.* 1995).

Les travaux de Caron *et al.* (1986b) furent les premiers à démontrer qu'une augmentation du phosphore foliaire et racinaire, suite à un amendement dans le substrat, ne cause pas la même diminution de la population d'un champignon pathogène que ce qui est observé chez les plantes colonisées par un champignon EA. Les auteurs concluent qu'une meilleure nutrition de la plante ne suffit pas pour expliquer l'effet observé. Les mêmes résultats ont été obtenus par St-Arnaud *et al.* (1994) avec leurs travaux sur les tagètes colonisées par le *Glomus intraradices* et confronté au *Pythium ultimum*. Ils attribuent la réduction de la présence du champignon pathogène par le champignon EA soit à une

stimulation des mécanismes de résistance ou à une interaction entre les deux champignons dans le sol.

5.2 Modification de la microflore

La colonisation endomycorhizienne produit des changements physiologiques importants à l'intérieur de l'hôte, ce qui affecte directement l'exsudation racinaire (Azcon-Aguilar et Bago 1994; Smith *et al.* 1994). Or, cette modification de la disponibilité des substances nutritives dans la rhizosphère modifie vraisemblablement l'équilibre de la microflore. De fait, plusieurs travaux ont rapporté des changements qualitatifs et quantitatifs des populations bactériennes dans l'environnement des racines de plantes endomycorhizées (Ames *et al.* 1984; Meyer et Linderman 1986). Fillion (1998) en quantifiant l'abondance des propagules de *Clavibacter michiganensis* f.sp. *michiganensis* dans les différentes zones du sol soit la rhizosphère, la mycophère et le sol distant sous l'influence de racines de tomates colonisées par le *Glomus intraradices*, observe une réduction de l'agent pathogène dans la rhizosphère seulement. Il suggère donc qu'un tel phénomène serait expliquable via une modification des exsudats de racines colonisées par un champignon EA. Bansal et Mukerji (1994), dans leurs travaux, notent une altération de la microflore fongique de la rhizosphère causée par le *Glomus macrocarpum*. Ils observent la suppression de champignons pathogènes comme les *Fusarium* sp. et une stimulation des champignons saprophytes comme les *Cladosporium* sp. Ils démontrent bien que ces changements dépendent directement d'une altération dans l'exsudation des racines de plantes colonisées par le champignon EA et non d'une amélioration de la nutrition phosphatée. Secilia et Bagyaraj (1987) ont isolé un plus grand nombre d'actinomycètes antagonistes du *Fusarium solani* et du *Pseudomonas solanacearum* à partir de la rhizosphère de plantes colonisées par des champignons EA que chez des témoins.

En plus de l'exsudation différentielle, l'influence directe du réseau d'hyphes extramatriciennes sur les microorganismes telluriques a été suggéré à maintes reprises pour expliquer les modifications observées (Caron *et al.* 1986a; Caron *et*

al. 1985; Garcia-Garrido et Ocampo 1988), mais la démonstration reste à faire. Puisqu'il est encore impossible de faire croître les champignons mycorhiziens sans leur hôte, il est difficile de vérifier si l'effet obtenu provient du réseau d'hyphes extramatriciel ou des racines de la plante endomycorhizée.

La mise au point récente d'une méthode de culture monoxénique *in vitro* de carottes transformées génétiquement dans un vase de Pétri à deux compartiments (St-Arnaud *et al.* 1995b) a permis pour la première fois d'isoler l'effet des hyphes sur les micro-organismes à l'étude. Cette méthode consiste à faire croître des racines endomycorhizées d'un côté du Pétri, tandis que de l'autre côté seules les hyphes et les spores du champignon endomycorhizien sont présents, permettant ainsi une confrontation directe avec les micro-organismes pathogènes à l'étude. Les auteurs ont observé une germination accrue des conidies d'un isolat du *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* en présence du *Glomus intraradices* par rapport aux témoins avec des racines non colonisées. Cette stimulation de la germination des propagules du champignon pathogène à proximité des hyphes du champignon mycorhizien aurait pour effet d'épuiser les réserves de ce dernier avant qu'il ne puisse infecter les racines de la plante hôte. Ce phénomène a été observé dans des interactions impliquant d'autres champignons telluriques (Papavizas et Lumsden 1980), mais c'est la première fois qu'on le propose pour expliquer l'effet néfaste des champignons endomycorhiziens sur les microorganismes pathogènes.

La production de substances antibiotiques par le réseau d'hyphes extramatriciel est un autre mécanisme à effet direct qui a été suggéré. Ce mécanisme a été identifié dans les interactions entre champignons ectomycorhiziens et microorganismes pathogènes (Sylvia et Sinclair 1981; Tsantrizos *et al.* 1991), mais pour les champignons endomycorhiziens, le phénomène reste à être démontré.

5.3 Stimulation des mécanismes de résistance de la plante

La colonisation mycorhizienne par un champignon EA induit des changements physiologiques et morphologiques importants chez la plante hôte. On note la

production accrue de phytoalexines ainsi que des enzymes impliquées dans ce sentier métabolique (PAL, CHS, CHI) (Grandmaison *et al.* 1993; Morandi *et al.* 1984), l'accumulation d'hydrolases végétales tel les chitinases et la β -1,3-glucanases (Dumas-Gaudot *et al.* 1992; Spanu *et al.* 1989), ainsi que l'induction de la synthèse de composés structuraux comme la lignine (Dehne et Schönbeck 1979) et les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGP_s) (Bonfante-Fasolo *et al.* 1991). Ces modifications présentent un caractère transitoire, puisque tous les chercheurs qui se sont attardés à doser les molécules reliées au système de défense de la plante durant la colonisation endomycorhizienne concluent qu'il y a une augmentation en début de colonisation et une suppression par la suite (Dixon *et al.* 1994; Gianinazzi-Pearson *et al.* 1996; Lambais et Mehdy 1995; Volpin *et al.* 1994; Volpin *et al.* 1995). Ces observations sont en accord avec l'hypothèse que la colonisation endomycorhizienne est tout d'abord considérée comme une agression microbienne par la plante au même titre qu'une infection par un agent pathogène et que la discrimination intervient lors de la reconnaissance du micro-organisme (Dassi *et al.* 1996; Dumas *et al.* 1989).

A la lumière de ces informations, Benhamou (1995) propose que les endomycorhizes puissent stimuler la phase transcriptionnelle menant à l'accumulation des ARNm alors que la phase post-transcriptionnelle, menant à la synthèse des molécules de défense, serait activée lors des toutes premières étapes de l'infection pour être ensuite supprimée lorsque l'association symbiotique serait reconnue. Ce n'est qu'à la suite d'un nouveau signal de stress que l'étape supprimée serait réactivée et entraînerait la production immédiate de molécules de défense. Ce phénomène de sensibilisation de la plante par un champignon endomycorhizien n'a pu être mis en évidence clairement car la majorité des travaux effectués sur l'induction des mécanismes de défense lors de la mycorhization ne tenait pas compte du rôle joué par l'agent pathogène dans l'expression de la résistance. Cependant, quelques résultats tendent à appuyer cette hypothèse. Dehne et Schönbeck (1979) observent une augmentation du métabolisme des phénols et une déposition de lignine dans les parois cellulaires au niveau de l'endoderme et de la stèle, dans les tomates endomycorhizées et

infectées par le *Fusarium oxysporum*. Cordier *et al.* (1996) notent une réduction dans la quantité des hyphes du *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* dans des racines de tomates colonisées par le *Glomus mosseae*. Niemira *et al.* (1996) enregistrent une réduction de la pourriture sèche fusarienne sur des tubercules de deuxième génération ayant des niveaux de colonisation très faible. Benhamou *et al.* (1994a) en utilisant un système *in vitro* de racines de carotte transformées (modification de Bécard et Fortin 1988) colonisées par le *Glomus intraradices* et exposées à l'attaque par le *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* observent une croissance des hyphes du *Fusarium* qui est limitée à l'épiderme et aux premières couches du cortex. Cette colonisation restreinte est associée à une altération morphologique et ultrastructurale des hyphes avec désorganisation du cytoplasme, rétraction de la membrane plasmique et formation de vésicules entre la paroi et la membrane rétractée. De plus, les cellules hôtes abritant ces hyphes altérées présentent des modifications significatives, tel que l'accumulation de phénol dans ces cellules et dans les espaces intercellulaires, ainsi que la formation d'apposition pariétales (composé de callose) ressemblant à des papilles.

D'autres hypothèses ont été proposées pour expliquer l'activité protectrice de la colonisation endomycorhizienne. Notamment, la compétition pour les sites d'infection, pour les composés carbonés provenant de l'hôte et des changements dans l'architecture du système racinaire des plantes endomycorhizées. Cependant, peu d'évidences sont présentement disponibles pour appuyer ces hypothèses.

Il est fort probable que plusieurs de ces mécanismes agissent de façon concomitante dans les milieux naturels, d'où la difficulté de cerner le phénomène observé.

6. Mécanismes de défense des plantes

Nous pouvons séparer les mécanismes de défense des plantes en deux catégories : ceux qui sont passifs (préexistants) et ceux qui sont actifs (induits).

La résistance passive est basée sur les propriétés anatomiques et physiologiques propres à chaque plante. Cette résistance constitutive existe grâce à la présence de barrières physiques comme la cuticule, les poils, les épines et les stomates et de barrières métaboliques tel la présence de composés phénoliques, de lactones, de composés cyanogènes, de tannins et autres. Ces substances antimicrobiennes sont accumulées sous des formes non-toxiques, en plus ou moins grande concentration dans les vacuoles des plantes saines. Lors d'une infection, il y a éclatement vacuolaire et relâchement de ces composés qui, une fois oxydés, deviennent toxiques pour l'agent pathogène.

La résistance induite est caractérisée par une séquence d'événements qui peut être décomposée en trois étapes majeures: 1) reconnaissance entre les deux partenaires; 2) traduction des signaux de reconnaissance; 3) activation des gènes de défense (Benhamou 1995). La reconnaissance se fait entre un polysaccharide ou une glycoprotéine provenant de la paroi de l'agent pathogène et une protéine (lectine) de la paroi végétale. La spécificité de cette reconnaissance est déterminée par la capacité qu'on les lectines à reconnaître des différences infimes dans les résidus saccharidiques. Dès qu'il y a reconnaissance, l'agent pathogène va produire des pectinases et des cellulases pour pénétrer la paroi végétale tandis que la plante produira des chitinases et β -1,3-glucanases pour se défendre. Ces enzymes agiront au niveau de la paroi de l'agent pathogène et libéreront des produits éliciteurs (Anderson-Prouty et Albersheim 1975; Keen et Yoshikawa 1983) qui iront s'associer à des récepteurs au niveau de la membrane plasmique végétale. Cette association entraîne une dépolarisation membranaire et la transmission du signal éliciteur au génôme de la plante. Cette transmission se fait par l'intermédiaire de messagers secondaires qui pourraient être l'acide salicylique, l'acide jasmonique, l'éthylène et le peroxyde d'hydrogène. Par la suite, il y a expression des gènes de défense, dont les produits ont été bien caractérisés et qui sont regroupés en trois grandes catégories de composés. Les composés structuraux, qui incluent la callose, la lignine (Barber *et al.* 1989) et les HRGP_s (Mazau et Esquerré-Tugayé 1986) utilisés dans la formation de papilles. Les phytoalexines, issues du métabolisme

secondaire agissent comme antibiotiques (Davis *et al.* 1986). Finalement, les composés protéiniques, soit les enzymes, les protéines de stress (glucanases, chitinases) (Kombrink *et al.* 1989; Mauch *et al.* 1988) et inhibiteurs de protéases (Bishop *et al.* 1981). L'ensemble des recherches suggère que toutes les plantes, qu'elles soient sensibles ou génétiquement résistantes, possèdent l'arsenal nécessaire à l'établissement d'une stratégie défensive. L'issue de l'interaction plante-parasite dépend de la rapidité avec laquelle se produisent la synthèse et l'accumulation de ces molécules de défense (Kúc 1987).

7. Éliciteurs du potentiel naturel de défense des plantes.

La stimulation du potentiel naturel de résistance des plantes par des éliciteurs avant la confrontation avec l'agent pathogène prémunit ces dernières et leurs confèrent un avantage. L'utilisation d'éliciteurs comme agents de lutte dans le contrôle biologique est un outil prometteur dans le domaine de la phytoprotection (Benhamou 1995; Hammerschmidt et Dann 1997). D'une part, il existe des éliciteurs abiotiques comme les sels d'argent, les métaux lourds, les détergents, les peptides synthétiques, l'acide salicylique, les radiations ultraviolettes, les blessures. D'autre part, on reconnaît des éliciteurs biologiques comme le chitosane dérivé de l'exosquelette de crabe (Benhamou *et al.* 1994b), les PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) comme le *Pseudomonas fluorescens* (Benhamou 1996), les PGPF (plant growth promoting fungi) (Meera *et al.* 1994). Les champignons endomycorhiziens semblent aussi avoir un potentiel éliciteur (Benhamou *et al.* 1994a), bien que ces résultats n'aient été observés que sur des racines de carottes transformées. Des différences très marquées dans les quantités de PAL, 6.5 fois plus élevées dans les racines de carottes transformées par rapport aux racines provenant de plantes entières (Shatilla 1995), confirment que ce système n'est pas optimal pour ce genre de travaux. Il est donc nécessaire de reprendre ces expériences d'élicitation avec un système de plantes entières.

8. Projet de maîtrise

Les champignons endomycorhiziens sont des candidats intéressants comme éliciteurs des mécanismes de défense chez les plantes, puisqu'ils ont généralement un effet bénéfique sur la croissance végétale et ils font partis des micro-organismes de la rhizosphère. Le but de ce projet de recherche est d'étudier le potentiel du *Glomus intraradices* comme éliciteur des mécanismes de défense de plantules de carottes *in vivo*. L'interaction plantules de carottes, *G. intraradices* et *Pythium* sp., fût choisie pour plusieurs raisons ; 1) nous voulions un système similaire à celui de Benhamou *et al.* (1994a), 2) nous voulions une maladie qui avait une importance économique dans nos régions, 3) parce qu'un marqueur pour le *Pythium* était disponible pour la microscopie électronique à transmission (MET).

Le premier chapitre porte sur une nouvelle méthode pour produire une colonisation endomycorhizienne arbusculaire uniforme et rapide par le *Glomus intraradices*. Le deuxième chapitre présente la démarche faite pour la sélection de l'isolat de *Pythium* et sa méthode d'inoculation. Le troisième chapitre décrit les observations sur les changements induits dans un tel système à l'aide de la microscopie électronique à transmission (MET) couplée à l'utilisation de marqueurs à l'or colloïdal - enzymes.

CHAPITRE 1

Colonization potential of *in vitro*-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores as compared with endomycorrhizal root segment inoculum from open pot culture

Un partie de ce manuscrit, ayant comme coauteurs : B. Vimard, M. St-Arnaud, V. Furlan et J.A. Fortin a été acceptée le 25 décembre 1998 pour publication dans la revue Mycorrhiza (1999) Vol.8, No 6, pp.335-338. Ce travail traite du potentiel infectueux qu'ont les spores de *Glomus intraradices* produit *in vitro* en comparaison avec des segments de racines endomycorhizés pour coloniser des plants de poireaux. Cette étude démontre clairement que ces spores constituent un inoculum de qualité.

ABSTRACT

Use of a reliable inoculum, free from other microorganisms, to produce arbuscular mycorrhizal (AM) plants is of the greatest importance to study the interaction between AM plants and soil microorganisms. We investigated the colonization of leeks from monoxenic *in vitro*-produced *Glomus intraradices* spores. The isolated spores required were produced using a two-compartment *in vitro* growth system. A spore suspension was used as inoculum and was compared with the inoculum potential of endomycorrhizal root segments of pot-grown leek plants. The plants were grown in a controlled environment and two types of sterilized growth media were tested: calcined montmorillonite clay (Turface) and a soil mix. Root colonization progressed faster in the soil mix. In this medium, after an initial delay, root colonization from *in vitro*-produced spores was similar to that observed with the root segment inoculum, reaching respectively 44% and 58% after 16 weeks. Leek roots colonized from the monoxenically-produced spores were free from other fungi while the roots colonized from the root segments regularly harbored contamination by other fungi. A co-culture system was developed by sowing carrot seeds beside these endomycorrhizal leek plants. This system quickly and uniformly colonized carrot seedlings which provides high quality endomycorrhizal material for biochemical and molecular investigations.

Keywords: Inoculum, Fungal contaminant, Co-culture, Spore, Soil, Glomales, AM

INTRODUCTION

An intimate relationship between vascular plants and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) has developed over the course of 400 million years of coevolution (Remy *et al.* 1994; Simon *et al.* 1993). This symbiosis is ubiquitous in natural ecosystems and is formed in the roots of a wide variety of host plants (Smith and Read 1997). Over the last 30 years, recognition of the importance of this complex association has led to a profusion of studies, along with an ever increasing need for methods to produce contamination free endomycorrhizal plants.

AMF propagules exist as spores, hyphae, isolated vesicles, mycorrhizal root segments or colonized soil (Biermann and Linderman 1983a; Diop *et al.* 1994; Sylvia and Schenck 1983). Until now, root segments and isolated spores from open pot culture (Gilmore 1968) of AM inoculated plants has been the usual source of AM inoculum for research needs (Ferguson and Woodhead 1982). However, this type of inoculum requires a large space to be produced and is prone to contamination even if good phytosanitary care is observed (Ames and Linderman 1978). Moreover, spores from open pot culture need to be isolated and surface sterilized before use and these are tedious manipulations. Other methods such as hydroponic culture (Mosse and Thompson 1984), aeroponic culture (Hung and Sylvia 1988; Sylvia and Hubbell 1986), alginate encapsulation of root segments (Strullu and Plenchette 1990) or spores (Calvet *et al.* 1996), as well as the use of glass beads as substrate (Redecker *et al.* 1995) have been developed in an attempt to increase the quality and reliability of the inoculum. However, the production of propagules under aseptic conditions remains one of the most promising ways to obtain high quality pathogen-free inoculum desirable for research purposes.

In vitro culture of AM fungi was done for the first time in the early 1960's (Mosse 1962). Since this pioneering work, the use of Ri T-DNA-transformed carrot roots as the host plant has permitted the increase in spore production of *Glomus mosseae* (Mugnier and Mosse 1987), *Gigaspora margarita* (Bécard and Fortin 1988), and *Glomus versiforme* (Declerck *et al.* 1996). Isolation of the fungal

symbiont from the plant root partner, using a two compartment Petri dish, was the most successful way yet to achieve large production of spores of *Glomus intraradices* (Fortin *et al.* 1996; St-Arnaud *et al.* 1996), making these propagules even more attractive for mass-production of inoculum.

Since we lack knowledge on the colonizing potential of these propagules, it was mandatory to develop a suitable method to use such propagules in order to assess their root colonizing ability. This paper compares the colonizing potential of *in vitro*-produced spores with that from vesicle-bearing root segments, along with the effect of the growth medium on the colonization dynamics of leek plants. Particular attention was given to the presence of fungal contaminants in the colonized roots.

Concerned primarily with the investigation of host defense responses elicited by AM fungi, we needed a large amount of contamination-free seedlings with high and uniform levels of AM colonization. Brundrett *et al.* (1985) obtained near synchronous colonization by transplanting seedlings into established pot cultures. Hyphae growing from the mature leeks colonized the seedlings in numerous sites simultaneously. This method is very promising for developmental, biochemical, physiological or molecular studies. However, the repeated use of the same mother AM leek plants has led to contamination with undesired fungi in our laboratory and in others (Rosewarne *et al.* 1997). We, therefore, modified the method described by Brundrett *et al.* (1985) by using aseptically-produced spores to inoculate the mother leek plants, in order to decrease the possibility of introducing contaminants into the system.

MATERIALS AND METHODS

Source of inoculum

The root segments inoculum consisted of AM leek (*Allium porrum* L.) roots from open pot culture colonized at 82% of root length with *Glomus intraradices* Schenck & Smith (DAOM 181602), mixed with the growth medium in which these plants were grown. The growth medium contained 60 spores/g fresh w.t. The

same isolate of *G. intradices* was grown *in vitro*, in a two-compartment Petri dish, as described by St Arnaud *et al.* (1996).

To prepare the aseptic spores inoculum, the colonized gelose from the root-free compartment of a seven-month-old colony was aseptically cut in 1 cm² pieces. The gel pieces were stirred and solubilized in 100 ml of a citrate buffer solution (Doner and Bécard 1991) at 30°C for 15 minutes. The mycelium suspension was filtered over a 0.45µm nylon mesh (Micron Separation Inc., Fisher Scientific). The spores collected on the mesh were rinsed, transferred into a sterile blender and homogenized in 30 ml of sterile distilled water for 40 seconds at low speed in order to separate clumped spores. Subsamples of this homogenate were used to test the viability of the spores. The homogenate concentration was adjusted to 15 spores/ml.

Spores viability

The spore viability was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT bioassay (An and Hendrix 1988). Following a 40 hours incubation period at 25°C in the dark, the spores were observed under a dissecting microscope at x 40 magnification. The percentage of viable spores was determined by assessing the formation of colored formazans in subsamples of 100 spores. Four subsamples were evaluated each time a new spore inoculum was prepared (each experimental block) and the mean viability was calculated.

Leek seedlings preparation

Seeds of *A. porrum* cv Bleu de Solaise were surface sterilized 20 minutes in 1.8% sodium hypochloride solution and rinsed twice with sterile distilled water. They were sown in 30 cm² plastic flats filled with Turface, previously autoclaved twice for 1 hour (121°C) at 2 days interval and then saturated with Long Ashton nutrient solution (Hewitt 1966). Seedlings were allowed to grow for 3 weeks. In order to minimize seedling damage at transplantation, the growing flats were first submerged in water so the Turface became buoyant.

Effect of growth substrate and inoculum type on AM colonization of leek seedlings

Plastic pots (15 cm) were disinfected by soaking overnight in a 1.8% sodium hypochlorite solution, and thoroughly rinsed with water before use. The pots were then filled with either of two different growth media, Turface or a soil mix. The soil mix was prepared by mixing equal parts of a peat-based medium (Pro-Mix, Tourbières Premier, Rivière-du-Loup, Canada), Perlite, Turface and soil from a leek field (61% sand, 22% limestone, 17% clay, 4% organic matter, pH 5.7)(Yao Konan 1996). Both media were previously autoclaved twice for 1h (121°C) at 2 days interval and then saturated with Long Ashton nutrient solution (Hewitt 1966). This procedure has been repeatedly used in our laboratory to kill AMF propagules in growth substrates and plants subsequently grown without AMF inoculation never shown any sign of AM colonisation. Therefore, in order to save space in growth cabinets, the uninoculated controls were omitted in this specific experiment.

Pots were filled with 1.2 L of either of the growth medium. In the pots designed for the root segments inoculum treatment, 10 g (fresh w.t.) of inoculum were uniformly spread to form a layer 2 cm under the substrate surface and 35 leek seedlings (3-week-old) were transplanted in each pot. In pots designated for the *in vitro* spores inoculum treatment, inoculation was done by dipping the seedlings root system in the spore suspension before transplanting in the substrate and by adding 100 ml of the spore suspension in each pot. Each seedling was numbered in order to facilitate randomization at harvest.

The plants were maintained in a growth cabinet, watered as needed with distilled water and fertilized with 120 ml of Long Ashton nutrient solution every second week until the end of the experiment. Fluorescent lamps were operated 16h·d⁻¹ at a photon flux of 450 microEinstein·m⁻²·s⁻¹ (PAR). Relative humidity was 60-70% and temperatures were 23°C (day) and 16°C (night).

The experimental design was a split plot in five blocks with the two growth media randomized among the main plots and the two inoculum types randomized

among the subplots. Treatments were replicated five times. The different blocks were started at one week intervals. Three seedlings were randomly harvested 4, 8, 12 and 16 weeks after inoculation in each pot. The roots of each seedling were considered separately for estimation of root colonization. They were washed under tap water, cut in 1-cm sections, cleared in 10% KOH and stained with acid fuchsin (Kormanik and McGraw 1982). The percentage of root length colonized by *G. intraradices* or by unidentified contaminant fungi was determined using the gridline intersect method (Giovannetti and Mosse 1980) under a dissecting microscope at x 80 magnification. Only the root segments containing arbuscules or vesicles were considered colonized by *G. intraradices*.

Effect of spore age on the rate of colonization of leek seedlings

A spore inoculum was prepared (as previously described) from 3, 5 and 7 month-old cultures. Since it takes approximately one month to produce the first spores (St-Arnaud *et al.* 1996), the ages of the spores were roughly 2, 4 and 6-months. Leek seedlings were inoculated, as described before, in plastic pots (15 cm) filled with 1.2 L of the soil mix substrate. Twelve weeks after inoculation, 36 leek seedlings were harvested in the 3-month-old spore inoculum treatment, 21 leek seedlings in the 5-month-old spore inoculum treatment, and 15 leek seedlings in the 7-month-old spore inoculum treatment. The root systems were handled as described above and the percentage of root length colonized by *G. intraradices* was evaluated.

Colonization of carrot seedlings in co-culture with AM leek plants

Twelve-week-old pot cultures containing AM leeks inoculated with the *in vitro* spore inoculum (as previously described) of *G. intraradices* and grown in the soil mix growth medium were used as mother pots. Seeds of *Daucus carota* cv. Carochoice (Société coopérative agricole du sud de Montréal, 291 St-Patrice, Sherington, Québec, Canada) were rinsed in 90% ethanol (to remove Thiram® fungicide), surface sterilized 20 minutes in 1.8% sodium hypochloride solution,

and rinsed twice with sterile distilled water before sowing at a rate of 25 seeds/mother pot. The experiment was replicated six times.

Five seedlings per pot were randomly harvested 7 days after sowing (at seedling emergence), and 2, 4, 8 and 14 days thereafter. Roots from each seedling were cleared and stained as previously described, and mounted lengthwise on a microscope slide. A slip of transparent graph paper with a 1-mm grid was fastened to the underside of each microscope slide. Roots were observed at x 100 magnification and each 1-mm segment was assessed separately. The length of each root and the number of 1-mm segments containing external hyphae, appressoria, internal hyphae, arbuscules and vesicles were recorded. The root length containing each of these fungal structures was calculated for each sample date (Brundrett *et al.* 1985).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed with General Linear Model Procedures of SAS software (SAS Institute Inc. 1992). The data were subjected to an analysis of variance. When a significant ($P < 0.05$) effect was found, a *posteriori* comparisons were done by the Tukey studentized range test ($P < 0.05$). In order to meet the requirements of the tests, arcsine transformation (Draper and Smith 1981) was performed on the percentage of root length harboring unidentified contaminants in the experiment on the effect of growth media and inoculum type on the AM colonization and rank transformation (Lehman 1975) was performed on the percentage of root length bearing arbuscules in the experiment of carrot seedlings colonization. The data taken at week four in the experiment on the effect of growth media and inoculum type on AM colonization were not analyzed by ANOVA because no transformation had permitted to achieve a normal distribution of the residues.

RESULTS

Effect of substrate, inoculum type and spore age on AM colonization of leek seedlings

In vitro-produced spores were highly viable with a mean of 96.4% of viability. Inoculum type and media used had a significant effect ($P<0.05$) on the colonization dynamics. Four weeks after inoculation, the plants which received the root segment inoculum were colonized at a level of 20% in Turface and of 30% in the soil mix substrate, while those inoculated with the spores were initiating colonization (0.2%) in the soil mix and showed no traces of AM colonization in Turface (Table I). By eight weeks, all treatments showed at least traces of colonization. Sixteen weeks after inoculation, the spore inoculum in the soil mix medium has given a similar AM colonization level as the root segment inoculum in Turface. Throughout the experiment only traces of colonization were detectable in the spore inoculated plants in Turface.

At all harvest periods and in all growth media, the use of root segment inoculum led to a mean colonization from unidentified fungal contaminants of 15%, while the use of the *in vitro*-produced spore inoculum generated roots with virtually no visually detectable contamination (Table II and Fig. 1a). In general, fungal contaminants were localized in the root epidermal cells (Fig. 1b).

A significantly higher percentage of colonization by *G. intraradices* was measured in leek roots inoculated with younger spores from *in vitro* cultures of 3 and 5-months-old (Table III). Twelve weeks after inoculation, leek roots were four times more colonized when inoculated with spores from 3-month-old cultures (71.8%) than with spores from 7-month-old cultures (18.5%). The mean viability of the spores harvested from 3, 5 and 7-month-old cultures was 75.0%, 96.5% and 96.4%, respectively.

Colonization of carrot seedlings in co-culture with AM leek plants

At emergence, carrot seedlings already bore a high percentage of external hyphae (46%), internal hyphae (39%) and appressoria (38%)(Table IV and

Fig. 1c). The presence of these structures did not increase until day-eight at which time they reached 58%, 52%, and 55%, respectively. At the final harvest, less external hyphae and appressoria were found on the roots of the carrot seedlings. Though infrequent, arbuscules (Fig. 1d) were already observed at the emergence of the seedlings. By day-eight, these structures were observed in 17% of the root length and this level increased to 25% at the end of the experiment. Vesicles (Fig. 1e) appeared in 2% of the root length after eight days and were still present by day fourteen. In the 30 seedling's root systems observed, at each time period, the proportion of the different AM structures were relatively uniform, as indicated by the standard errors of the means (Table IV). Generally, the variability in the presence of these structures was greater at emergence and lowered with time leading to a more uniform colonization between plants.

DISCUSSION

Until now, monoxenically-produced spores have never been conclusively tested for their ability to perform well in soil (Lovato *et al.* 1995). In this experiment, we demonstrated the high viability potential of *in vitro*-produced spores, as well as their ability to induce AM colonization in a soil medium. The aseptically-produced inoculum yielded endomycorrhizal leek plants with 47% of root length colonized by *G. intraradices*, 16 weeks after inoculation. Moreover, after this time period, roots were still free from microscopic fungal contaminants, while the roots of plants inoculated with the root-segment-and-soil inoculum had a high proportion of root length bearing other microscopic fungi. A large proportion of the previous research conducted with AM fungi used endomycorrhizal root segments and soil obtained from open pot culture as inoculum (Ferguson and Woodhead 1982). Such a practice yields new cultures that are more prone to contaminations, as repeatedly observed (Abbott and Robson 1981; Biermann and Linderman 1983a; Menge 1984; Millner and Kitt 1992; Walker and Vestberg 1994). Inoculating pot cultures with an aseptically-produced *in vitro* spore inoculum, as done in this experiment, limits root contamination. Such a method is better suited to

investigate interactions between AM plants and soil microorganisms without interference from undesirable microorganisms. Furthermore, the inoculum source, which consists of a two-compartment Petri dish culture, does not require a large amount of space nor a lot of care to maintain a reserve of high quality inoculum.

One possible major draw back of *in vitro*-produced spore inoculum is that it needs to be maintained in subcultures on agar media and questions may be raised concerning the infectivity and the genetic stability of these cultures after many years. Laiho (1970), as well as Marx and Daniel (1976) have shown that after several years of subculture, ectomycorrhizal fungi can lose their ability to colonize plant roots. Recently, Plenchette *et al.* (1996) have demonstrated a decrease in infectivity of *in vitro*-produced *Glomus versiforme* spores and mycorrhizal root pieces to colonize leek plant roots after only three generations. In this experiment, infectivity loss during successive generations was not directly estimated. However, subculturing *G. intraradices* did not seem to adversely affect spore viability or infectivity since the *in vitro*-produced spores used were harvested from a 30th subculture, while viability was very high and infectivity was comparable to non-*in vitro*-produced inoculum providing soil substrate was used.

The four week delay observed before the spore inoculum began to colonize leek plants might be related to an innate dormancy of spores since viability was almost 100% as measured with the MTT test. Similar differences between spores and root segments were previously observed by Warner and Mosse (1980) and Biermann and Linderman (1983b). It was suggested that the root segments were readily infective because they contain active hyphae with intraradical vesicles, structures that probably did not need any physiological modification and had no nutritional or hormonal deficiencies (Powell 1976). On the other hand, spores might need to go through a dormancy period before they can germinate and produce infective hyphae. Tommerup (1983) concluded that newly formed spores of *Glomus* spp. have an innate dormancy of six weeks in wet soil and that no environmental condition will shorten this maturation period before germination. This is in accordance with our results as we observed an initial lag period of more than four weeks but less than eight weeks. Recent work in our laboratory has

demonstrated that a six week cold treatment on the spore suspension of *G. intraradices* eliminates this delay before germination (Nantais 1997). This finding increases the interest of spores has an inoculum since the germination delay could be eliminated using cold treatment. It must be emphasized that despite the delay observed in our experiment, both types of inoculum led to approximately 50% of root length colonization after 16 weeks.

The age of the *in vitro*-produced spores used to prepare the inoculum influences the speed of colonization. After 12 weeks of growth, the leek roots inoculated with spores from 3-month-old cultures reached 72% of colonized root length, which is four times higher than the level obtained with the spores from 7-month-old cultures. These results are in disagreement with Tommerup's (1983) observations that all spores of each species are innately dormant when first formed. The discrepancy between our results and his could be due to anatomical or physiological differences between *in vitro* spores and pot culture-produced spores.

The results obtained with the spore inoculum emphasize the importance of the growth media in comparison of inoculum performance. In Turface, almost no colonization was observed with *in vitro*-produced spore inoculum while, in the soil mix, this inoculum led, eventually, to the same infection level than the root-segment-and-soil inoculum. The use of soil mix growth media to produce endomycorrhizal leeks in pot culture clearly shortened the time needed to achieve a high level of AM colonization, regardless of inoculum type. These results are in accordance with others previously reported. Biermann and Linderman (1983b) found that in media containing soil, geranium roots were more extensively colonized by *Glomus fasciculatum* as compared with geranium roots grown in soilless media. Also, micropropagated grapevine showed a more significant growth response to AM inoculation in peat/sand and soil media when compared to a substrate without soil amendment (Schubert *et al.* 1990). The use of soil based growth media in horticultural research involving AM fungi presents some challenges; it increases the risk of introducing soilborne pathogens (Estaun *et al.* 1994), requires more tedious manipulations when retrieving the root systems and

the hyphal network (Caron *et al.* 1985), and the resulting higher weight of substrate may limit the progression of AM mycelia (Camel *et al.* 1991).

In our experiments, the soil mix growth medium used contained different amendments to palliate these problems. This soil mix consisted of an equal volume of mineral soil, perlite, peat and Turface. The use of soil as part of a growth medium is thought to enhance the availability of minerals to the plant therefore improving its nutritional status (Gaunt 1978). It ensures a more natural environment for soilborne microorganisms, beneficial to AM colonization. Perlite lightens the substrate, which facilitates the progression of AM mycelia. Adding 25% of peat in a soil also lightens the substrate, improves water retention and provides a better cation exchange capacity to the growth medium. Many types of peat are available but they do not provide the same benefits. We added a commercial peat-base mix, Promix (Tourbière Premier, Rivière-du-Loup, Qc), to incorporate organic matter in the growth media which brought the pH of the soil mix to 6.0-6.5. Finally, we introduced Turface for its capacity to aerate the soil, improve drainage and also increase cation exchange capacity of the soil. The use of Turface only, with spore inoculum did not permit good colonization probably because of its coarse texture. We postulate that a large number of spores were washed out before germination. Using 25% of Turface in the growth medium provided a good solution to this problem. The best advantages of this mix is; 1) good texture, 2) easy to manipulate.

Sowing carrot seeds into pots with an already established symbiosis permitted to get high levels of almost uniform root colonization in a few days. Eight days after emergence, the percentage of root length colonized with external hyphae, internal hyphae, arbuscules and vesicles were respectively 58%, 55%, 17%, and 2%. Brundrett *et al.* (1985) obtained similar results while working with seedlings instead of seeds. Both methods allow for the production of numerous mycorrhizal seedlings in a short period of time, so that they are suitable for biochemical and molecular investigations., the use of seeds instead of seedlings provides the additional benefits of removing the transplantation stress and decreasing the number of manipulations.

As mentioned by Koide and Schreiner (1992), mycorrhizal fungal inoculum used in experiments related to host defense responses elicitation must be of the highest purity. One must ensure that microbes, typically associated with mycorrhizal fungi, are not the elicitors. Since, in our study, the pot cultures used for co-culturing the carrot seeds were started with an *in vitro*-produced spore inoculum, the carrot seedlings were less inclined to harbour fungal contaminants in their roots. Therefore, they are more suitable for experiments which aim to determine whether mycorrhizal fungi elicit defense responses when challenged by pathogenic microorganisms. Furthermore, this approach provides cleaner material which is also critical in microbial dynamics studies. Here, studying three, four or more interacting organisms leads to highly complicated systems (Andrade *et al.* 1997) where very unstable and unpredictable situations can arise if a contaminant is present in the studied system.

In conclusion, using monoxenically-produced spores as AM inoculum in a soil mix growth media yielded the same level of root colonization on leek plants as using mycorrhizal root segments in Turface (conventional system), sixteen weeks after inoculation, with a far lower level of fungal contamination. Younger spores seem to germinate readily, which ensures that the leek plants benefit from an early establishment of mycorrhizae. Co-culture of carrot seeds with pre-colonized leeks quickly produces seedlings with uniform and high level of AM colonization exempt from visible fungal contamination.

The inoculation system proposed in this paper provides a new approach suitable for the production of large amounts of uniform and reliable AM seedling material needed for biochemical and molecular investigations of the AM symbiosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank S. Daigle for good advice on experimental design and statistical analysis, and M. Tessier and L. Nantais for linguistic revision of the manuscript. This research was supported by a CRSNG operating grant to J.A. Fortin.

REFERENCES

- Abbott LK and Robson AD (1981) Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: Effect of inoculum type. *Aust J Agric Res* 32: 631-639
- Ames RN and Linderman RG (1978) The growth of easter lily (*Lilium longiflorum*) as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum*, and fertility level. *Can J Bot* 56: 2773-2780
- An ZQ and Hendrix JW (1988) Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1997) Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192: 71-79
- Bécard G and Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218
- Biermann B and Linderman RG (1983a) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol* 95: 97-105
- Biermann B and Linderman RG (1983b) Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular-arbuscular mycorrhizae. *J Am Soc Hortic Sci* 108: 962-971
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL (1985) A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can J Bot* 63: 184-194
- Calvet C, Camprubi A, Rodriguez-Kabana R (1996) Inclusion of arbuscular mycorrhizal fungi in alginate film for experimental studies and plant inoculation. *Hortscience* 31: 285
- Camel SB, Reyes-Solis MG, Ferrera-Cerrato R, Franson RL, Brown MS, Bethlenfalvay GJ (1991) Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium through bulk soil. *Soil Sci Soc Am J* 55: 389-393
- Caron M, Fortin JA, 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

- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C (1996) *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol Res* 100: 1237-1242
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG (1994) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5: 17-22
- Doner LW and Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol Tech* 5: 25-28
- Draper NR and Smith H (eds) (1981) Applied regression analysis. Wiley, New-York
- Estaun E, Calvet C, Camprubi A (1994) Arbuscular mycorrhizae and growth enhancement of micropropagated Prunus root stock in different soilless potting mixes. *Agr Sci Finland* 3: 263-267
- Ferguson JJ and Woodhead SH (1982) Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Schenck NC (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press, St Paul, MN, pp 47-54
- Fortin JA, St-Arnaud M, Hamel C, Chavarie C, Jolicoeur M (1996) Aseptic *in vitro* endomycorrhizal spore mass production. US Patent Number 5,554,530
- Gaunt RE (1978) Inoculation of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi on onions and tomato seeds. *NZ J Bot* 16: 69-71
- Gilmore AE (1968) Phycomycetous mycorrhizal organisms collected by open-pot culture methods. *Hilgardia* 39: 87-105
- Giovannetti M and Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500
- Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, London
- Hung L-L and Sylvia DM (1988) Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl Environ Microbiol* 54: 353-357
- Koide RT and Schreiner RP (1992) Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 557-581
- Kormanik PP and McGraw AC (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck, NC (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, APS Press, St Paul MN, pp 37-45

- Laiho O (1970) *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. Acta Forest Fenni 106: 1-13
- Lehmann, E. 1975. Nonparametrics - Statistical Methods Based on Ranks. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, CA.
- Lovato PE, Schuepp H, Trouvelot A, Gianinazzi S (1995) Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchard and ornamental plants. In: Varma A, Hock B (eds) Mycorrhiza. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 443-467
- Marx DH and Daniel WJ (1976) Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. Can J Microbiol 22: 338-341
- Menge JA (1984) Inoculum production. In: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) VA Mycorrhiza. CRC Press, FL, pp 187-203
- Millner PD and Kitt DG (1992) The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 2: 9-15
- Mosse B (1962) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. J Gen Microbiol 27: 509-520
- Mosse B and Thompson JP (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. Can J Bot 62: 1523-1530
- Mugnier J and Mosse B (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopathology 77:1045-1050
- Nantais LM (1997) Optimization of arbuscular mycorrhizal inoculum through selection and increased production of *Glomus intraradices* propagules. Msc Thesis, Université de Montréal
- Plenchette C, Declerck S, Diop TA, Strullu DG (1996) Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot roots. Appl Microbiol Biotechnol 46: 545-548
- Powell CL (1976) Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. Trans Br Mycol Soc 66: 439-445
- Redecker D, Thierfelder H, Werner D (1995) A new cultivation system for arbuscular mycorrhizal fungi on glass beads. Angew Bot 69: 189-191

- Remy W, Taylor TN, Hass H, Hass K (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Nat Acad Sci* 91: 11841-11843
- Rosewarne GM, Barker SJ, Smith SE (1997) Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. *Mycol Res* 101: 966-970
- SAS Institute Inc. 1992. The SAS System for Windows 3.10, release 6.08. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Schubert A, Mazzitelli M, Ariusso O, Eynard I (1990) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevine: Influence of endophyte strain, P fertilization and growth medium. *Vitis* 29: 5-13
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Smith SE and Read DJ (eds) (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol Res* 100: 328-332
- Strullu D-G and Plenchette C (1990) Encapsulation de la forme intraracinaire de *Glomus* dans l'alginate et l'utilisation des capsules comme inoculum. *C R Acad Sci Paris*, t. 310, Série III: 447-452
- Sylvia DM and Hubbell DH (1986) Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259-267
- Sylvia DM and Schenck NC (1983) Application of superphosphate to mycorrhizal plants stimulates sporulation of phosphorus-tolerant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 95: 655-661
- Tommerup IC (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans Br Mycol Soc* 81: 37-45
- Walker C and Vestberg M (1994) A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agr Sci Finland* 3: 233-240

Warner A and Mosse B (1980) Independent spread of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans Br Mycol Soc* 74: 407-410

Yao Konan M (1996) Influence de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance et le rendement de cultivars d'oignon (*Allium cepa* L.) soumis à différentes conditions culturales. Msc thesis, Université Laval

TABLES

Table I. Effect of substrate and inoculum type on percentage of root colonization of leek seedlings by *G. intraradices*. Values in each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by the Tukey studentized range test.

| Substrate | Inoculum type | Root length colonized by <i>G. intraradices</i> | | | |
|-----------|-------------------------------------|---|-------|-------|-------|
| | | Weeks after inoculation | | | |
| | | 4 ¹ | 8 | 12 | 16 |
| Turface | Root segments | 20.2 | 34.6b | 34.2c | 40.5b |
| | <i>In vitro</i> spores ² | 0.0 | 0.5a | 0.3a | 0.0a |
| Soil mix | Root segments | 30.8 | 54.0c | 65.8d | 58.3c |
| | <i>In vitro</i> spores | 0.2 | 4.5a | 18.5b | 43.5b |

¹Data from the four-week sampling were not submitted to ANOVA analysis because no transformation had permitted to achieve a normal distribution of the residues

²Spores were 6 months-old

Table II. Effect of substrate and inoculum type on the percentage of root length of leek plants colonized by unidentified contaminant fungi. Values in each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by the Tukey studentized range test.

| Substrate | Inoculum type | Root length colonized by unidentified fungi contaminant | | | |
|-----------|-------------------------------------|---|-------|-------|-------|
| | | Weeks after inoculation | | | |
| | | 4 | 8 | 12 | 16 |
| Surface | Root segments | 16.1a | 19.6a | 17.2a | 11.8a |
| | <i>In vitro</i> spores ¹ | 1.5b | 4.2b | 0.8b | 0.7b |
| Soil mix | Root segments | 26.3a | 11.4a | 9.8a | 8.1a |
| | <i>In vitro</i> spores | 1.1b | 0.6b | 1.1b | 1.1b |

¹ Spores were 6 months-old

Table III. Effect of age of the *in vitro* *G. intraradices* cultures from which the spores were extracted on the AM colonization of leek roots after 12 weeks in pot culture. Values with the same letter are not significantly different at $P < 0.005$ by the Tukey studentized range test.

| Culture age | Root length colonized by <i>G. intraradices</i> |
|-------------|--|
| | % |
| 3 months | 71.8 a |
| 5 months | 59.8 a |
| 7 months | 18.5 b |

Table IV. Percentage of root length of carrot seedlings harboring external hyphae, appressoria, internal hyphae, arbuscules, and vesicles of *G. intraradices* during a 14-day period after seedling emergence. Values in each row followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ by the Tukey studentized range test.

| AM Structures | Days after emergence | | | | |
|-----------------|--------------------------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | 0 | 2 | 4 | 8 | 14 |
| External hyphae | 46.4ab ¹ ±4.5 | 42.9ab±3.7 | 38.0a±3.7 | 57.7b±2.5 | 36.0a±2.3 |
| Appressoria | 37.8ab±4.8 | 34.0ab±3.7 | 30.8a±4.0 | 52.4b±2.4 | 33.4a±2.0 |
| Internal hyphae | 39.3ab±4.8 | 34.4ab±3.8 | 31.8a±4.0 | 55.2b±2.9 | 54.2b±2.9 |
| Arbuscules | 4.4a±2.1 | 2.6a±1.0 | 4.9a±1.6 | 17.4b±3.7 | 25.2b±3.7 |
| Vesicles | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 1.5±0.1 | 0.7±0.3 |

¹ Percentage of the root length bearing the structure. Represent the mean of five root systems ± standard error of the mean.

FIGURES

Legend of figures

Figure 1a. Leek roots inoculated with *in vitro*-produced AM spores, showing vesicles of *G. intraradices* (Gi).

Figure 1b. Leek roots inoculated with AM root segments and colonized soil, showing vesicles of *G. intraradices* (Gi), and revealing the abundant presence of unidentified contaminant fungi (UCF) in the epidermal cells.

Figure 1c-e. Different AM structures present during the colonization of the root of carrot seedlings grown in co-culture with AM leek plants. **c**, At emergence of the carrot seedlings, external hyphae (Eh), appressoria (Ap) and internal hyphae (Ih) could be identified. **d**, Arbuscules (Ar) in the roots of a carrot seedling, two days after emergence. **e**, Vesicles (V) in eight-day-old carrot seedling roots.

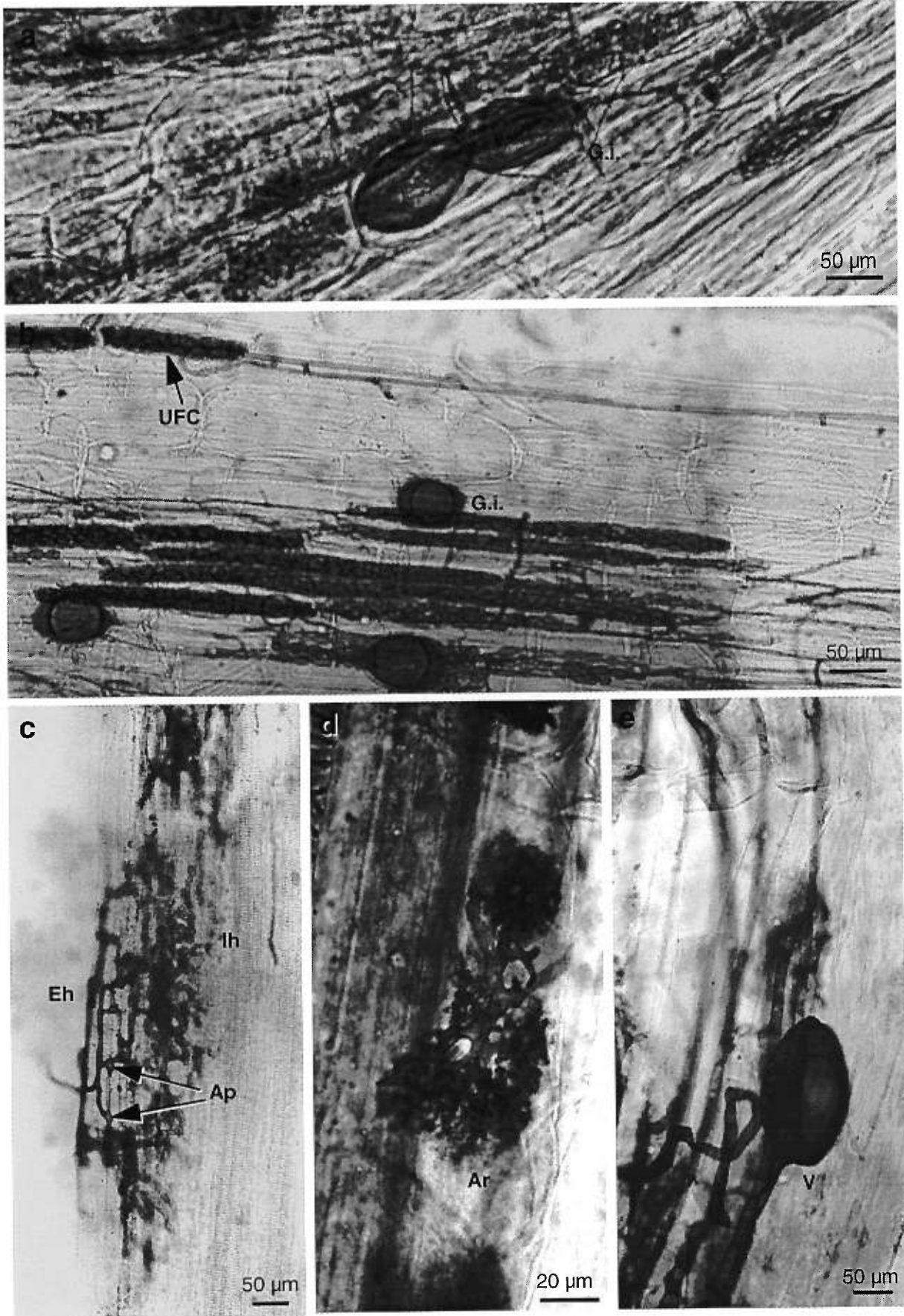


Figure 1.

CHAPITRE 2

SÉLECTION DE L'ISOLAT DE *PYTHIUM* ET DE LA MÉTHODE D'INOCULATION

INTRODUCTION

Le *Pythium ultimum*, responsable de la fonte des semis, du dépérissement pythien, ainsi que de la maladie de la tache, affecte une grande variété d'hôtes et a une distribution mondiale. Le contrôle de ces maladies est difficile, tant aux champs qu'en serre, puisque les sporanges peuvent persister dans les sols pour une période de plus de 11 mois (Stanghellinni et Hancock 1971). La fumigation du sol s'avère le moyen le plus utilisé, car la rotation des cultures est inutile et les cultivars résistants peu disponibles. Il en est ainsi car ce champignon pathogène infecte plusieurs espèces de plantes (Hendrix et Cambell 1973). L'utilisation de pesticides sur de grandes étendues est coûteuse et néfaste pour l'environnement, d'où l'importance de considérer une approche de contrôle biologique. Puisque des observations récentes ont démontré que des champignons endomycorhiziens peuvent contrôler des maladies causées par le *Pythium ultimum* (Rosendahl et Rosendahl 1990; St-Arnaud *et al.* 1994), nous avons voulu vérifier si la stimulation des mécanismes de défense naturels de la plante était impliqué dans ces interactions.

Le genre *Pythium* est un groupe de champignons qui comprend plusieurs espèces pathogènes des plantes. Il est classé parmi les oomycètes car il possède deux types de gamètes bien différenciés, les gamètes femelles (oogones) et les gamètes mâles (anthéridies). Ces deux types de gamètes sont formés sur leur propre gamétange et lors de la fécondation sexuée, ils se fusionnent pour produire un zygote. Le *Pythium* peut aussi se reproduire asexuellement à l'aide de spores flagellées (zoospores) qui se forment quand les conditions sont très humides. Ces zoospores sont rarement produites chez le *P.*

ultimum (Van der Plaats-Niterink 1981). Une autre caractéristique des oomycètes est leurs parois cellulaires composées principalement de cellulose, contrairement à la majorité des autres champignons dont la paroi est formée de chitine (Curtis 1983).

Les espèces pathogènes de ce genre infectent principalement les jeunes tissus, soit les plantules ou l'apex racinaire de plantes matures. Avant qu'il n'y ait infection, les propagules doivent germer. Chaque espèce de *Pythium* a besoin de conditions particulières pour favoriser la germination des spores. Le *Pythium ultimum* requiert des températures inférieures à 23°C, un sol très humide et la présence d'une plante susceptible à proximité. Après la germination, la pénétration s'effectue à la jonction de cellules épidermales par une hyphes de pénétration formée à partir d'un appressorium. Cette étape se produit 5 à 8 heures après inoculation, la colonisation du cortex après 24 heures et l'invasion de la stèle après 36 heures (Hendrix et Cambell 1973). Des travaux récents ont confirmé que le *P. ultimum* comptait parmi les espèces les plus agressives de *Pythium* (Benard et Punja 1995; Raffin et Tirilly 1995). Sa pathogénéicité réside dans sa rapidité à produire des enzymes pectolytiques et cellulolytiques (Campion 1997).

La méthode d'inoculation utilisée lors de travaux en chambre de croissance s'avère très importante puisque les *Pythium* sp. ne sont pas pathogènes dans toutes les conditions environnementales; ils sont parmi les champignons pathogènes les plus exigeants (Hendrix et Cambell 1973). Plusieurs méthodes d'inoculation ont été rapportées dans la littérature pour produire une infection par ce type de champignons. Il est possible de faire croître les *Pythium* dans un milieu liquide, de faire une suspension homogène de mycélium et de sporanges comme l'ont fait St-Arnaud *et al.* (1994), de zoospores comme dans les expériences de Raffin et Tirilly (1995), ou uniquement d'oospores comme Mandelbaum et Hadar (1997). Ces suspensions peuvent ensuite être incorporées au substrat à la concentration désirée. On peut aussi faire croître le *Pythium* directement dans le substrat, soit sur de la vermiculite (Benard et Punja 1995; Rosendahl et Rosendahl 1990; Schrandt 1994), de la tourbe (Mandelbaum,

1997) ou sur un mélange de farine de maïs et de sable (Howard *et al.* 1978) et utiliser ce substrat comme inoculum.

Finalement, une autre méthode fréquemment employée consiste en l'utilisation d'une pastille de gélose prélevée d'une colonie du *Pythium* en pleine croissance et déposée directement sur le système racinaire (Chérif *et al.* 1992a; Rey *et al.* 1998; Zamski et Peretz 1995), ou à distance (Mandelbaum et Hadar 1997; Mellano *et al.* 1970; Stephens *et al.* 1981). Le choix d'une de ces méthodes ou d'une combinaison d'entre elles dépend de l'espèce étudiée, ainsi que du niveau et de la rapidité d'infection recherchée.

Ce chapitre porte sur la sélection d'une espèce de *Pythium* et la mise au point d'une méthode d'inoculation sur des plantules de carottes en pot afin d'obtenir une infection rapide et uniforme. Cette étape était requise pour la réalisation de l'étude présentée au chapitre 3 et portant sur le rôle du *Glomus intraradices* dans la protection des plantules de carottes contre le *Pythium*.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Inoculation avec une suspension mycélienne

Des graines de carottes cv. Caro-choice (Société coopérative agricole du sud de Montréal, 291 St-Patrice, Sherington, Québec, Canada), préalablement stérilisées en surface dans une solution d'hypochlorite de sodium 1.8% et rincées à l'eau distillée stérile, sont semées dans des pots de 15 cm contenant 1.2 L de substrat. Le substrat utilisé consiste en un mélange à part égale de tourbe (Pro-Mix, Tourbières Premier, Rivière-du-Loup, Canada), de Perlite, de montmorillonite calcinée et d'un sol provenant d'un champ de poireaux (61% sable, 22% limon, 17% argile, 4% matière organique, pH 5.7; Annexe 2; Yao Konan 1996). Quelques jours avant la préparation des pots, le substrat est autoclavé (121°C) pendant 1 heure à deux reprises, deux jours consécutifs. Cinq semaines après le semis, les pots sont éclaircis pour ne garder que 15 plantules par pot. Ces plantules sont alors inoculées soit avec 50 ml d'une suspension

mycélienne du *P. ultimum* N1 (Dr T.C. Paulitz, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'environnement, Université McGill) ou de l'un de deux isolats du *Pythium violae* 3-25 et 3-28 (Dr. Z.K. Punja, Department of Biological Sciences, Simon Fraser University) ayant une concentration de 10^3 , 10^4 ou 10^5 propagules (CFU)·ml⁻¹, soit avec 50 ml d'eau distillée stérile. Un pot est préparé par traitement d'inoculation. Les pots sont ensuite arrosés et couverts d'un sac de plastique pour garder un taux d'humidité élevé (Stephens *et al.* 1981).

La suspension mycélienne est préparée à partir de plats de Pétri contenant 10 ml de gélose de flocons d'avoine additionnée de cholestérol 1.5% et solidifiée en position inclinée pour obtenir une pente. Vingt ml d'eau distillée stérile sont ajoutés ainsi qu'une pastille de 1.2 cm provenant de la marge d'une colonie du *P. ultimum* ou de l'un de deux isolats du *Pythium violae* et ayant poussé sur de la gélose de pomme de terre (PDA) pendant 3 jours. Après 20 jours de croissance à 24°C, le mycélium est récolté de la surface de l'eau de 10 plats de Pétri et est homogénéisé 20 secondes dans un homogénéisateur (Waring blender) contenant de l'eau distillée stérile. Les concentrations finales sont ajustées à 10^3 , 10^4 et 10^5 CFU·ml⁻¹, déterminées par dilution et inoculation sur PDA.

Après 1, 4 et 10 jours, 5 plantules sont prélevées au hasard dans chacun des pots et la présence de nécroses sur le système racinaire est notée sur une échelle où 1=<1%, 2=1-3%, 3=4-5%, 4=6-10% et 5= >10% de tissu nécrosé. Les racines sont ensuite découpées en segments de 1 cm, colorées à la fuchsine acide (Kormanik et McGraw 1982) et le pourcentage de la longueur totale de racines infectées par le champignon pathogène est évalué (Brundrett *et al.* 1985). Dans cette expérience seul le cultivar de carottes Caro-choice a été évalué puisque les expériences de colonisation mycorhizienne (chapitre 1) ont été effectuées sur ce cultivar. En raison de l'absence de virulence obtenue lors de l'inoculation d'une suspension mycélienne du *P. ultimum* avec ce cultivar de carottes, d'autres cultivars ont été testés dans les essais ultérieurs, pour vérifier si Caro-choice n'est pas un cultivar résistant au pathogène.

Inoculation avec un substrat infesté

Dans des pots de 15 cm contenant 1.2 L de substrat (décrit plus haut), des graines de carottes cv. Caro-choice, Caro-chief, Cellobunch ou Apache préalablement stérilisées en surface ont été semées. Après 15 jours, 15 plantules de carottes ont été inoculées en déposant soit 0.1 g de substrat infesté (150,000 CFU du *P. ultimum*-g⁻¹), soit 0.1 g de substrat identique autoclavé, sur leur système racinaire dénudé à l'aide d'une spatule. Les pots ont ensuite été bien arrosés, recouverts d'un sac de plastique pour garder un taux d'humidité élevé (Stephens *et al.* 1981) et mis dans une chambre de croissance dont la température était de 21°C le jour et 16°C la nuit. Il y avait un pot par cultivar et deux plantules ont été prélevées de chacun de ces pots après 7 et 14 jours. Leur système racinaire a été préparé comme décrit plus haut pour l'évaluation de la longueur totale infectée par le pathogène. Dans ce cas ci les symptômes visuels n'ont pas été enregistrés.

Le substrat infesté a été obtenu en mélangeant du sol préalablement séché provenant d'un champs de poireau (décrit plus haut), avec 1% (p/p) d'une poudre de flocons d'avoine. Ce substrat a été humidifié avec de l'eau distillée, placé dans des pots de verre de 500 ml (Mason). Les pots ont été remplis à moitié, fermés par un couvercle perforé de deux trous de 1.7 cm de diamètre contenant de la ouate, et ont été autoclavés deux fois (40 minutes, 121°C) deux jours consécutifs. Une fois refroidit, le *P. ultimum* N1 a été inoculé sous forme de mycélium. Le mycélium a été obtenu en inoculant des flacons de 250 ml contenant 100 ml de bouillon de pomme de terre (PDB, 2.4%)(p/v) avec une pastille de 1.2 cm de diamètre provenant d'une colonie du *P. ultimum* N1 âgée de 3 jours sur PDA. Les flacons ont été agités sur un agitateur orbital pendant 5 jours à 110 rpm. Le mycélium a été récolté aseptiquement d'un flacon est incorporé au substrat d'un pot en agitant ceux-ci manuellement. Par la suite, les pots ont été incubés à la température de la pièce (23°C) et à l'obscurité pendant 2 semaines. Durant cette période, les pots ont été agités tous les 2 jours pour

avoir un inoculum homogène. La densité de l'inoculum était de 150,000 CFU.g⁻¹ de sol, évaluée par dilution et inoculation sur PDA.

Inoculation avec pastilles de gélose

Premier essai

Dans des contenants à semis de 4 cm x 4 cm, 2 graines de carottes (4 cultivars mentionnés plus haut) préalablement stérilisées en surface ont été semées dans le mélange de sol autoclavé mentionné dans les deux autres expériences. À l'émergence, des pastilles de 1.2 cm du *P. ultimum*, *P. violae* 3-25 ou 3-28 provenant de la marge d'une colonie âgée de 5 jours sur PDA ont été déposées au niveau du collet sur le système racinaire dénudé. La pastille a ensuite été recouverte du même sol. Six contenants à semis de chacun des cultivars de carottes ont été inoculés avec chacun des isolats de *Pythium*. Après 6 jours, toutes les plantules (7-12) ont été prélevées de chacun des traitements et le pourcentage de plantules mortes a été noté.

Deuxième essai

La méthode décrite dans le premier essai a été reprise dans des pots de 15 cm en utilisant le cultivar de carottes Caro-choice et une seule espèce de champignon pathogène, le *P. ultimum* N1. L'inoculation avec les pastilles a été effectuée 11 jours après avoir semé les graines et le prélèvement des plantules a été fait 2, 4, et 6 jours après l'inoculation. Quinze plantules ont été prélevées à chacune des dates de prélèvement et 5 plantules témoins ayant été inoculées avec une pastille de PDA stérile ont été prélevées à la fin de l'expérience. Les racines ont été découpées en segments de 1 cm, colorées à la fuchsine acide (Kormanik et McGraw 1982) et le pourcentage de la longueur totale de racines infectées par le *P. ultimum* a été évalué (Brundrett *et al.* 1985).

RÉSULTATS

Aucune infection par le *Pythium ultimum* N1 n'a pu être mise en évidence dans les racines de plantules de carottes inoculées à l'aide d'une suspension mycélienne contenant 10^3 , 10^4 ou 10^5 propagules par ml des isolats testés (Tableau I). Dix jours après l'inoculation, les systèmes racinaires ne montraient aucun symptôme.

L'utilisation d'un inoculum de sol infecté par le *Pythium ultimum* N1 a donné des niveaux d'infection inférieurs à 5% sur tous les cultivars de carottes évalués (Tableau II). Le cultivar le plus susceptible était Caro-choice avec 3.6% de la longueur du système racinaire infectée par le *P. ultimum* N1, deux semaines après inoculation.

La technique d'inoculation des *Pythium* sp. à l'aide de pastilles a donné des moyennes de pourcentages de mortalité de plantules qui ont varié entre 20% avec le *P. violae* 3-28 et 60% avec le *P. ultimum* N1, 6 jours après inoculation (Tableau III). Les cultivars montraient une susceptibilité différente à chacun des isolats de *Pythium* sp. étudiés. Le cultivar Caro-chief a été le plus susceptible aux trois isolats, tandis que Caro-choice a montré une susceptibilité intermédiaire. L'inoculation de plantules de carottes cv Caro-choice avec des pastilles provenant d'une colonie du *P. ultimum* N1 a permis d'obtenir un pourcentage d'infection moyen de 55% (Tableau IV), 2 jours seulement après l'inoculation. De plus, l'infection était relativement uniforme comme nous l'indique l'erreur type de 5.1.

DISCUSSION

Le choix d'un type d'inoculum, ainsi que d'une méthode d'inoculation, pour des expériences en chambre de croissance s'avère crucial si l'on veut reproduire des niveaux d'infection équivalents à ceux causés par la fonte des semis en serre ou aux champs. Ce choix dépend aussi des hypothèses que l'on veut vérifier et des

contraintes inhérentes aux outils avec lesquels ces hypothèses vont être évaluées.

Dans nos essais d'inoculation, l'utilisation d'une suspension constituée de segments d'hyphes et de sporanges du *P. ultimum* n'a pas permis l'infection de plantules de carottes, 10 jours après l'inoculation. St-Arnaud *et al.* (1994), en utilisant le même type d'inoculum, observent 20% de la longueur racinaire de plantes non-mycorhizées contenant du mycélium et 5% contenant des « hyphal swellings » attribuables au *Pythium ultimum*, 60 jours après l'inoculation. L'utilisation d'une suspension de segments d'hyphes, de sporanges ou d'oospores tend à être favorisée par plusieurs chercheurs en raison de la facilité avec laquelle on peut produire et quantifier cet inoculum. Par contre, Van der Plaats-Niterink (1981) note que le temps nécessaire pour causer des niveaux d'infection élevés est augmenté par rapport à un inoculum déjà établi dans le substrat. Mandelbaum et Hadar (1997) observent aussi qu'il faut attendre au deuxième cycle de croissance du champignon dans le substrat avant d'atteindre des niveaux de maladie significatifs lorsqu'on utilise une suspension d'oospores. Ils suggèrent que ce délai serait dû à l'inconsistance dans la germination des propagules. Ce type d'inoculum n'est donc pas adéquat pour des études sur les maladies de semis qui nécessitent une infection rapide.

L'inoculation de plantules de carottes avec un sol déjà infesté par le *P. ultimum* a produit une infection faible, 14 jours après l'inoculation. Mandelbaum et Hadar (1997) obtiennent des résultats très différents en plantant des graines de concombre dans un sol infesté avec le *P. aphanidermatum*. Dans leurs travaux, la mortalité des semis atteint un taux de 60%, 14 jours après la plantation. Ces différences dans leurs observations par rapport aux nôtres peuvent être attribuables à plusieurs facteurs. D'abord, l'espèce de *Pythium* et sa virulence pour la plante hôte utilisée dans les expériences pourraient expliquer ces différences. Le choix du *P. ultimum* et de la carotte, dans nos travaux, fût basé sur les informations recueillies dans la littérature et classant cet agent pathogène comme un des plus agressifs sur la carotte, dû à sa capacité à produire des enzymes pectolytiques (Benard et Punja 1995; Champion 1997). Par contre, sur la

tomate, Raffin et Tirilly (1995) observent une plus grande sévérité de la maladie causée par le *P. aphanidermatum* qu'avec le *P. ultimum*.

Deuxièmement, la méthode d'inoculation choisie par Mandelbaum et Hadar (1997) utilise des graines plutôt que des plantules âgées de 2 semaines comme dans nos essais. Cette méthode favorise l'action du parasite qui est un champignon pathogène s'attaquant uniquement à des tissus juvéniles (Hendrix et Cambell 1973). Bien que plus efficace, nous ne pouvons pas utiliser une méthode d'inoculation sur des graines, le but de nos travaux étant de vérifier l'hypothèse que l'endomycorhization induit une résistance accrue des plantes à l'infection par un agent pathogène. Les carottes devaient donc être âgées d'un minimum de 7 jours pour que le champignon endomycorhizien ait le temps de coloniser ces dernières et de 14 jours pour que nous puissions obtenir une présence que l'on peut visualiser avec la microscopie électronique à transmission (cf. chapitre 1).

L'application d'une pastille de gélose recouverte du champignon pathogène en croissance active s'est avérée la méthode la plus efficace pour infecter des plantules de carottes âgées de 7 jours. Cette méthode nous a permis d'obtenir, en moyenne, une mortalité de 50% des semis avec le *P. ultimum*. Il est à noter que les travaux utilisant la microscopie électronique à transmission (Chérif *et al.* 1992a; Rey *et al.* 1998) ou à balayage (Zamski et Peretz 1995) favorisent cette méthode d'inoculation en raison des exigences inhérentes à la préparation du matériel. Ces techniques nécessitent l'utilisation de racines ayant des niveaux d'infection uniformes et surtout élevés car des sections de 2 mm² seulement sont prélevées.

Lors du premier essai il fût possible de sélectionner l'isolat du *Pythium* sp. le plus agressif et d'évaluer la susceptibilité des différents cultivars de carottes à notre disposition. L'interaction du *Pythium ultimum* sur le cultivar Caro-choice a donné une infection intermédiaire, après six jours. Les racines possédaient des signes de nécrose sans la macération des tissus, comme ce fût le cas avec les cultivars Caro-chief ou Cellobunch.

La reprise de cette méthode avec l'interaction sélectionnée fût essentielle pour suivre le développement de l'infection du *P. ultimum* dans les racines de carottes en fonction du temps. Les résultats obtenus ont confirmé que cette méthode produisait une infection uniforme du système racinaire. De plus, il fût noté que 50% du système racinaire des plantules de carottes étaient infecté par le *P. ultimum* après 48 heures, ce qui nous a permis de raccourcir le temps nécessaire avant le premier prélèvement.

CONCLUSION

Bien que ne représentant pas nécessairement le plus adéquatement une infection naturelle de fonte des semis, l'infection avec une pastille de milieu gélosé recouverte d'un pathogène en croissance active fût sélectionné. Cette méthode appliquée à l'interaction *P. ultimum* sur cultivar de carottes Caro-choice représente la combinaison optimale pour poursuivre notre étude ultrastructurale des mécanismes impliqués dans la résistance des plantes endomycorrhiziennes à un champignon pathogène.

BIBLIOGRAPHIE

- Benard D et Punja ZK (1995) Role of *Pythium* species in cavity spot development on carrots in British Columbia. *Can J Plant Pathol* 17: 31-45
- Brundrett MC, Piche Y, Peterson RL (1985) A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can J Bot* 63: 184-194
- Campion C (1997) Agressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *Eur J Plant Pathol* 103: 725-735
- Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR (1992a) Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 411-425
- Chérif M, Menzies JG, Benhamou N, Bélanger R (1992b) Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 371-385
- Curtis H (1983) *Biology*. Worth, New York.
- Hendrix FF et Cambell WA (1973) Pythiums as plant pathogens. *Annu Rev Plant Phytopathol* 11: 77-98
- Howard RJ, Pratt RG, Williams PH (1978) Pathogenicity to carrots of *Pythium* species from organic soils of North America. *Phytopathology* 68: 1293-1296
- Kormanik PP et McGraw AC (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. Dans : NC Schenck (éd) *Methods and Principles of Mycorrhizal Reseach*. APS Press, St-Paul MN, 37-45
- Mandelbaum R et Hadar Y (1997) Methods for determining *Pythium* suppression in container media. *Compost Sci & Util* 5: 15-22
- Mellano HM, Munnecke DE, Endo RM (1970) Relationship of seedling age to development of *Pythium ultimum* on roots of *Antirrhinum majus*. *Phytopathology* 60: 935-942
- Rafin C et Tirilly Y (1995) Characteristics and pathogenicity of *Pythium* spp. associated with root rot of tomatoes in soilless culture in Brittany, France. *Plant Pathol* 44: 779-785

- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1998) Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathology* 88: 234-244
- Rosendahl CN 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
- Schrandt J (1994) Host range and influence of nutrition, temperature, and pH on growth of *Pythium violae* from carrot. *Plant Dis* 78: 335-338
- Stanghellinni ME et Hancock JG (1971) The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopathology* 61: 157-164
- St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA (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
- Stephens CT, Powell CC, Schmitthenner AF (1981) A method of evaluating postemergence damping-off pathogens of bedding plants. *Phytopathology* 71: 1225-1228
- Van der Plaats-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus *Pythium*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
- Yao Konan M (1996) Influence de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance et le rendement de cultivars d'oignon (*Allium cepa* L.) soumis à différentes conditions culturales. Mémoire de maîtrise, Université Laval
- Zamski E et Peretz I (1995) Cavity spot of carrots: interactions between the host and pathogen, related to the cell wall. *Ann. Appl. Biol.* 127: 23-32

TABLEAUX

Tableau I. Effet de la concentration en propagules de la suspension mycélienne de trois isolats de *Pythium* sp. sur le pourcentage de nécroses racinaires de plantules de carottes cv Caro-choice en fonction du temps d'incubation.

| Temps (jrs) | Espèce pathogène | | | | | | | | |
|----------------|----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | <i>P. ultimum</i> N1 | | | <i>P. violae</i> 3-25 | | | <i>P. violae</i> 3-28 | | |
| | 10 ^{3†} | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ | 10 ³ | 10 ⁴ | 10 ⁵ |
| 1 | 1* | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

* 1=<1%, 2=1-3%, 3=4-5%, 4=6-10% et 5= >10%; ces valeurs sont la moyenne de 5 systèmes racinaires.

†concentration de l'inoculum (CFU. ml-1)

Tableau II. Pourcentage de la longueur racinaire de quatre cultivars de carottes infectée par le *P. ultimum* N1 inoculé avec du sol infesté.

| Temps (jrs) | Cultivars | | | |
|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Apache | Cellobunch | Caro-choice | Caro-chief |
| | Moyenne ± ET | Moyenne ± ET | Moyenne ± ET | Moyenne ± ET |
| 7 | 0.0 ± 0.0 | 1.4 ± 1.4 | 3.1 ± 0.4 | 1.3 ± 0.4 |
| 14 | 1.3 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 3.9 ± 3.3 | 3.4 ± 0.9 |

*Ces valeurs sont la moyenne de deux systèmes racinaires ± l'erreur type.

Tableau III. Effet de l'inoculation sous forme de pastilles de gélose de trois isolats de *Pythium* sp. sur le pourcentage de mortalité des plantules de quatre cultivars de carottes après six jours d'incubation.

| Cultivars | Espèce pathogène | | | Moyenne±ET |
|-------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| | <i>P. ultimum</i> N1 | <i>P. violae</i> 3-25 | <i>P. violae</i> 3-28 | |
| Apache | 16.7 | 40.0 | 30.0 | 28.9±6.7 |
| Cellobunch | 83.3 | 22.2 | 0.0 | 35.2±24.9 |
| Caro-choice | 33.3 | 50.0 | 10.0 | 31.1±11.6 |
| Caro-chief | 100.0 | 57.1 | 37.5 | 64.8±18.3 |
| Moyenne±ET | 58.2±19.8 | 42.3±7.6 | 19.5±8.8 | |

Tableau IV. Pourcentage de la longueur du système racinaire de plantules de carottes cv Caro-choice infectées par le *P. ultimum* N1 inoculé sous forme de pastilles de gélose, en fonction du temps d'incubation.

| Temps (jrs) | <i>P. ultimum</i> N1 |
|----------------|----------------------|
| | %* \pm ET |
| 2 | 54.6 \pm 5.1 |
| 4 | 64.0 \pm 5.5 |
| 6 | 22.5 \pm 3.8 |

*Ces valeurs sont la moyenne de 15 systèmes racinaires \pm l'erreur type.

CHAPITRE 3

RÔLE DU *GLOMUS INTRARADICES* DANS LA PROTECTION DES PLANTULES DE CAROTTES CONTRE LE *PYTHIUM ULTIMUM*

INTRODUCTION

Les changements physiologiques induits lors d'une interaction plante-micro-organismes peuvent être évalués par le biais de plusieurs techniques. Il est ainsi possible de doser et de caractériser l'accumulation de phytoalexines à l'aide de la chromatographie en couches minces (TLC) comme l'ont fait Sundaresan *et al.* (1993) en étudiant l'interaction entre le *Glomus fasciculatum* et le *Fusarium oxysporum* chez *Vigna unguiculata*. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la spectrophotométrie ont aussi été utilisées pour quantifier et identifier les différentes phytoalexines produites lors de la colonisation par le *Glomus mosseae* et le *Rhizoctonia solani* dans les fèves de soja (*Glycine max*) (Wyss *et al.* 1989). L'électrophorèse en deux dimensions sur gel de polyacrylamide permet d'évaluer les changements protéiniques. Simoneau *et al.* (1994) ont utilisé cette méthode pour identifier la synthèse de nouveaux polypeptides à l'intérieur de racines de tomates transformées par le plasmide Ri de la bactérie *Agrobacterium rhizogenes*, lors de la colonisation par le *Glomus intraradices*. Ces méthodes nous donnent une vision globale des modifications qui s'effectuent à l'intérieur des racines mais ne nous informent pas sur la localisation des phénomènes observés.

L'introduction de méthodes cytochimiques basées sur la formation d'une sonde complexée à l'or colloïdal a permis de localiser différentes macromolécules au microscope électronique à transmission (MET) (Bendayan 1984). Cette technique, basée sur l'affinité qu'ont certaines molécules telles les enzymes pour des substrats particuliers, a été introduite pour localiser les acides nucléiques (Bendayan 1981). Depuis, cette technique s'est étendue à la localisation de

l'élastine, du collagène, des dépôts de glycogène dans le tissu animal et à la localisation de xylane (Vian *et al.* 1983), de chitine (Chamberland *et al.* 1985), de β -1,3-glucane (Benhamou 1993), de cellulose (β -1,4-glucane)(Benhamou *et al.* 1987) et de pectine (Benhamou *et al.* 1989) dans le tissu végétal. Il est aussi possible d'utiliser un complexe lectine - or colloïdal pour localiser une panoplie de polysaccharides comme la chitine, le mannose, le galactose, le fructose, etc. (Benhamou 1989). La localisation de composés pariétaux fongiques libres, comme la chitine et les β -1,3-glucanes nous renseigne indirectement sur la présence d'enzymes (chitinases, β -1,3-glucanases) dont l'activité dans la plante est augmentée en période de stress. Il est aussi possible de localiser la présence de ces enzymes directement par l'utilisation d'un complexe anticorps - or colloïdal (Benhamou *et al.* 1989; Benhamou *et al.* 1990).

Le marqueur utilisé avec cette technique, l'or colloïdal, dû à sa densité aux électrons et à la dimension de ses particules, permet un marquage de haute résolution ainsi qu'une évaluation quantitative des molécules localisées (Bendayan 1984). De plus, il est facile à utiliser puisque ce complexe enzyme - or colloïdal est appliqué directement en une seule étape sur les échantillons déjà préparés pour le MET.

Le choix de cette technique pour étudier les premiers moments de l'attaque par un champignon pathogène sur des plantules de carottes préalablement colonisées par le *Glomus intraradices* a été fait en raison de la grande quantité de molécules de défense pouvant être localisées au niveau ultrastructural. De plus, nous voulions confirmer les observations acquises *in vitro* par Benhamou *et al.* (1994a) sur un système de plante entière en sol. Le but de ce chapitre était donc d'étudier l'expression des mécanismes de résistance chez des plantules de carottes colonisées par le *Glomus intraradices* et attaquées par le *Pythium ultimum*, à l'aide du marquage à l'or colloïdal des molécules impliquées.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Préparation des pots mères

Des pots de plastique (15 cm), préalablement désinfectés dans une solution d'hypochlorite de sodium 1.8% et rincés à l'eau courante, ont été remplis avec 1.2 L de substrat saturé par une solution nutritive de Long Ashton (Hewitt 1966). Le substrat utilisé consiste en un mélange à part égale de tourbe (Pro-Mix, Tourbières Premier, Rivière-du-Loup, Canada), de Perlite, de montmorillonite calcinée et d'un sol provenant d'un champs de poireaux (61% sable, 22% limon, 17% argile, 4% matière organique, pH 5.7; Annexe 2; Yao Konan 1996). Quelques jours avant la préparation des pots, le substrat a été autoclavé (121°C) pendant 1 heure à deux reprises, à un jour d'intervalle.

Des plantules de poireaux « Bleu de Solaise », âgées de trois semaines, ont été transplantées à raison de 35 par pots. Lors de cette transplantation, l'inoculation du *Glomus intraradices* Schenck & Smith (DAOM 181602) a été effectuée. L'inoculum a été préparé en prélevant la gélose du compartiment sans racine d'un plat de Pétri à deux compartiments (St-Arnaud *et al.* 1996) contenant une colonie du *Glomus intraradices* âgée de 7 mois. La gélose contenant les spores et les hyphes du champignon endomycorhizien a été solubilisée (Doner et Bécard 1991). Les spores ont été récoltées et une suspension de 15 spores/ml a été préparée. Les plantules de poireaux ont été inoculées en trempant leur système racinaire dans cette solution de spores et en ajoutant 100 ml de cette solution dans chacun des pots. Le système racinaire des plantules témoins a été trempé dans de l'eau distillée stérile et 100 ml d'eau stérile a aussi été ajouté dans chacun des pots. Les pots-mères ont été gardés dans une chambre de croissance, arrosés au besoin avec de l'eau distillée et fertilisés aux deux semaines avec une solution nutritive de Long Ashton. Dans cette chambre de croissance, des lampes fluorescentes fonctionnent 16h/ j, l'humidité relative était de 60-70% et les températures ont été de 23°C (jour) et 16°C (nuit). Périodiquement, les pots ont été éclaircis pour ne garder que 15 plantules de poireaux dans chacun des pots. Seize semaines après l'inoculation, 3 plantules

de poireaux ont été récoltées dans chacun des pots, le système racinaire a été prélevé et coloré (Kormanik et McGraw 1982) et le pourcentage de racines colonisées par le *G. intraradices* a été évalué (Giovannetti et Mosse 1980).

Colonisation des plantules de carottes par le *G. intraradices*

Huit pots de 15 cm contenant des poireaux âgés de 16 semaines ont été transférés dans une petite chambre de croissance dont les paramètres étaient similaires à ceux décrits plus haut. La moitié de ces pots contenait des poireaux endomycorhizés à 70% en moyenne et l'autre moitié contenait des poireaux non endomycorhizés. Trente graines de carottes (*Daucus carotta* cv Caro-choice) (Société coopérative agricole du sud de Montréal, 291 St-Patrice, Sherington, Québec, Canada), préalablement stérilisées en surface dans une solution d'hypochlorite de sodium 1.8% et rincées à l'eau distillée stérile, ont été semées dans chacun de ces pots. Deux semaines plus tard les pots ont été inoculés avec le *Pythium ultimum*.

Inoculation des plantules de carottes avec le *P. ultimum*

Deux pots de chacun des traitements, plantules de carottes endomycorhizées et plantules de carottes non-endomycorhizées, ont été sélectionnés au hasard pour l'infection par le *Pythium ultimum* N1 (Dr T.C. Paulitz, Faculté des sciences de l'agriculture et de l'environnement, Université McGill). À l'aide d'un emporte pièce, des pastilles de 1.2 cm de diamètre ont été coupées d'une culture du *Pythium ultimum* N1 âgée de 5 jours sur milieu de gélose de pomme de terre (PDA). Le système racinaire de chacune des plantules a été déterré à l'aide d'une spatule en aluminium et une pastille de gélose a été appliquée dessus, à 1 cm sous la surface du sol. Par la suite la pastille et les racines ont été recouvertes de sol. Cette manipulation a été effectuée sous une hotte à flux laminaire pour diminuer les possibilités d'infection par d'autres microorganismes.

Prélèvement des échantillons et préparation des tissus pour la microscopie électronique à transmission (MET)

Les plantules de carottes provenant des quatre différents traitements, soit le *G. intraradices* seul (G⁺P⁻), le *P. ultimum* seul (G⁻P⁺), le *G. intraradices* et le *P. ultimum* (G⁺P⁺) et le témoin (G⁻P⁻), ont été prélevées au nombre de 10 par traitement (5 par pot). Le système racinaire a été nettoyé délicatement à l'eau courante et déposé dans quelques gouttes d'une solution de glutaraldéhyde 3%, paraformaldéhyde 3% (1:1) dans un tampon de cacodylate de sodium (CaCO) 0.2 M pH 7.2 pour préserver les tissus. Quatre sections de 2 mm ont été prélevées de chacun des systèmes racinaires, près des zones de lésion (lorsque visible) pour augmenter les chances de déceler la présence du champignon pathogène dans les échantillons. Ces prélèvements ont été faits 1 et 2 jours après l'inoculation avec le *Pythium ultimum*.

Les systèmes racinaires d'où l'on a prélevé les sections ont été découpés en morceaux de 1 cm de longueur, colorés à la fuchsine acide (Kormanik et McGraw 1982) et montés sur une lame sous laquelle était collé un morceau de papier quadrillé millimétrique transparent (Brundrett *et al.* 1985). Les lames ont été examinées au microscope optique à 100x. La longueur totale du système racinaire ainsi que le nombre de segments de 1 mm contenant des structures du *G. intraradices* (vésicules et/ou arbuscules) et du *P. ultimum* (« hyphal swelling ») ont été évalués. Lors de cette évaluation, nous avons constaté la présence du *P. ultimum* dans tous les traitements, y compris les pots où il n'avait pas été inoculé. Il fût convenu de couper et d'observer les échantillons provenant du traitement P⁺G⁺ et de reprendre l'expérience pour obtenir les témoins manquants. Lors du deuxième essai, l'infection par le *P. ultimum* fût très faible et en coupe semi-fine, nous n'avons pas pu observer d'hyphes du champignon pathogène. Dû au manque de temps, un troisième essai n'a pu être fait. Les échantillons qui ont été coupés et observés dans cette étude sont donc des racines de carottes colonisées par le *G. intraradices* et inoculées par le *P. ultimum* provenant du premier essai.

Les échantillons de 2 mm ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde 3%-paraformaldéhyde 3% à la température ambiante pendant 4 heures, puis à 4° C pour la nuit. Après quatre rinçages consécutifs dans le tampon CaCO 0.1M pour 15 minutes, la moitié des échantillons a été post-fixée dans une solution d'acide osmique à 1% dans un tampon CaCO 0.1M pH 7.2 pour deux heures à 4° C. Tous les échantillons ont ensuite été déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol (30-90%) avant d'être traités à l'éthanol 100%, puis au mélange éthanol-oxyde de propylène. Les échantillons ont enfin été enrobés dans la résine WPE 145 (JBEM Services Pointe-Claire, BP 693, Dorval, Québec; Annexe 1), puis placés dans une étuve à 37°C pour une nuit et à 60°C pour environ 36 heures.

Préparation des coupes

Dans un premier temps, des coupes semi-fines ont été préparées sur un microtome (Bromma, LKB 88000) pour vérifier la présence des microorganismes dans les échantillons. Les coupes ont été colorées au bleu de toluidine 2%, chauffées à 65-95°C sur une plaque chauffante et observées au microscope optique à 100x. Les blocs de résine contenant des échantillons intéressants ont été identifiés et les coupes ultra-fines (0.7µm) ont alors été préparées à l'aide d'un ultra-microtome (Ultratome III, RMC MT-7000, EMLab Equipment). Les coupes ont été déposées sur des grilles de nickel. Les échantillons ont ensuite été préparés pour le marquage cytochimique à l'or colloïdal.

Marquage cytochimique à l'or colloïdal

L'or colloïdal avec des particules de diamètre moyen de 15 nm a été préparé selon Frens (1973). Pour la localisation de la cellulose présente dans les parois du *P. ultimum*, une exoglucanase (β -1,4-D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.21) purifiée à partir d'une cellulase produite par le *Trichoderma harzianum* est conjuguée à l'or colloïdal à pH 9.0 selon la méthode décrite par Benhamou *et al.* 1988. Les coupes ultra-fines ont d'abord été déposées dans une goutte de tampon phosphate salin (PBS) contenant 0.02% de polyéthylène glycol (PEG), à

pH 6.0, puis ont été transférées sur une goutte du complexe exoglucanase - or colloïdal pour 30 minutes à la température de la pièce, en chambre humide. Ensuite, les grilles ont été lavées dans le PBS, rincées à l'eau distillée et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

Les échantillons ont finalement été observés au microscope électronique à transmission JEOL 1200 EX à 80kV.

RÉSULTATS

Colonisation mycorhizienne et infection par le champignon pathogène

La colonisation mycorhizienne par le *G. intraradices* était uniforme dans tous les systèmes racinaires des plantules inoculées (G^+P^+ , G^+P^-), avec une valeur moyenne de colonisation de 81,7% (Tableau I). L'infection des systèmes racinaires par le *P. ultimum* était plus variable, allant de 15% à 75% de la longueur totale, avec une moyenne de 49,9% (Tableau I). Les racines des plantes témoins infectées par le *P. ultimum* mais sans le *G. intraradices* étaient déjà dans un état avancé de macération au premier prélèvement (24 heures). De plus, tous les traitements non-inoculés par le *P. ultimum* ont été contaminés par le parasite. Nos observations ont donc dû être limitées aux plantes ayant été inoculées par le *G. intraradices* et le *P. ultimum*.

Observations ultrastructurales

L'examen des échantillons prélevés dans la zone d'interaction entre les deux organismes a permis de déceler la présence d'hyphes du *P. ultimum* adjacentes aux hyphes du *G. intraradices* (Fig. 1a, b). Une journée après l'inoculation du champignon pathogène, les hyphes du *P. ultimum* présentaient de graves dommages, essentiellement caractérisés par une rétraction du plasmalemme et une vacuolisation accentuée (Fig. 1c), tel que comparé à une hyphe normale (Fig. 1b). Fréquemment, les hyphes du *P. ultimum* étaient complètement vidées de leur contenu et apparaissaient comme des coquilles pleiomorphiques « ghost cells » (Fig. 1d, 2a). Ces observations ont été faites autant dans des cellules

contenant des hyphes du champignon mycorhizien que dans des cellules à distance de ces dernières.

Au niveau de la plante, des signes de réactions de défense incluant la déposition de matériel dense aux électrons (apposition pariétale) sur la paroi primaire des espaces intercellulaires ont été observées. Cette structure, ressemblant à un début de formation de papilles, est apparue 24 heures après l'infection par le champignon pathogène (Fig. 2b). Nous notons une invasion massive de nouvelles hyphes du *P. ultimum* dans les cellules épidermales et cette pénétration est accomplie par la constriction des hyphes du champignon pathogène (Fig. 2d). Finalement, nous avons pu observer à une seule occasion la présence d'hyphes du champignon pathogène à l'intérieur d'une hyphe du champignon mycorhizien (Fig. 2c).

DISCUSSION

Les travaux des dernières années dans le domaine des endomycorhizes arbusculaires confirment le rôle de ces dernières dans l'amélioration de la production végétale par leur action sur les maladies racinaires (Caron 1989; Perrin 1990; St-Arnaud *et al.* 1995a). Bien que les mécanismes en jeu soient encore peu connus, les évidences recueillies selon différentes approches multidisciplinaires supportent l'hypothèse selon laquelle la suppression des maladies racinaires par les champignons endomycorhiziens impliquerait l'effet synergique de plusieurs mécanismes incluant l'induction de réactions de défense chez la plante (Benhamou 1995). Ainsi, à plusieurs reprises, la stimulation des mécanismes de résistance de la plante à été suggérée pour expliquer la diminution de la sévérité de la maladie chez les plantes endomycorhizées (Caron *et al.* 1986; Gianinazzi 1991; Morandi *et al.* 1984; Rosendhal 1985). Des travaux récents ont permis de confirmer cette hypothèse. Grandmaison *et al.* (1993) ont démontré qu'il y avait une production accrue de composés phénoliques (acides ferulique et p-coumarique, N-feruloytyramine) lors de la colonisation endomycorhizienne de racines d'oignon par le *Glomus intraradices* et le *Glomus*

versiforme. Ces composés liés aux membranes cellulaires semblent augmenter significativement la résistance de cette dernière à la pénétration par des champignons pathogènes. Dumas-Gaudot *et al.* (1992) ainsi que Spanu *et al.* (1989) ont observé une accumulation d'hydrolases végétales telles les chitinases et les β -1,3-glucanases, des enzymes qui affectent l'intégrité membranaire des champignons pathogènes mais qui n'affectent pas les tissus du champignon endomycorhizien à arbuscule. Blee et Anderson (1996) ainsi que Harrison et Dixon (1994) ont rapporté une accumulation de produits de gènes de défense dans les cellules contenant des arbuscules. Cordier *et al.* (1996) ont noté que les hyphes du champignon pathogène *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* n'infectaient jamais les cellules colonisées par des arbuscules du *Glomus mosseae*. De leur côté, Benhamou *et al.* (1994a) ont observé une restriction de la croissance des hyphes du *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* dans le rhizoderme et le cortex des racines de carottes transformées par le Ri T-DNA et colonisées par le *Glomus intraradices*.

Les observations obtenues dans cette étude supportent les résultats présentés par Benhamou *et al.* (1994a), puisque comme eux nous avons observé que les hyphes du champignon pathogène présentaient des signes de désorganisation cytoplasmique caractérisés par la formation de vacuoles et la rétraction du plasmalemme. Ces observations suggèrent un phénomène de fongitoxicité causé par la production de métabolites secondaires comme les composés phénoliques et les phytoalexines. Il est bien connu que ces métabolites ont le potentiel de modifier le métabolisme fongique et d'interférer avec la synthèse enzymatique (Southern et Deverall 1990). Il semble plus probable que les substances fongitoxiques seraient les premières armes utilisées par la plante pour contrer l'invasion d'un champignon pathogène suite à l'infection, suivies par l'action d'enzymes hydrolytiques comme les β -1,3-glucanases et les chitinases qui contribueraient à la désintégration complète des cellules fongiques (Benhamou *et al.* 1994a; Benhamou et Thériault 1992). Nous avons aussi observé la présence d'une apposition pariétale pouvant être une papille au niveau d'un point de pénétration du champignon pathogène. Selon les

résultats obtenus par Chérif *et al.* (1992a) ainsi que Benhamou *et al.* (1994a), ce type de réaction de la plante hôte n'est pas détecté dans les racines qui n'ont pas été préalablement sensibilisées par un agent abiotique ou biotique. L'hypothèse que les auteurs émettent pour expliquer de tels résultats est que ces agents éliciteurs stimulent la phase transcriptionnelle menant à l'accumulation des ARNm, mais la phase post-transcriptionnelle est réprimée pour limiter la dépense énergétique. Ce n'est que lors de l'arrivée du signal généré par l'infection de l'agent pathogène que la suppression est levée et qu'il y a accumulation rapide de produits des gènes de défense. Dans l'interaction à l'étude, le *Glomus intraradices* aurait donc agi comme éliciteur des mécanismes de résistance de la plante au même titre que le chitosane (Benhamou *et al.* 1994a) ou la silice (Chérif *et al.* 1992a).

Les plantules de carottes ont tout de même succombé à l'agression par le *P. ultimum* car malgré les efforts de la plante pour contrer sa pénétration, les propagules de ce dernier étaient vraisemblablement trop nombreuses. La méthode d'inoculation du champignon pathogène utilisée dans cette étude, soit l'application d'une pastille de gélose supportant la croissance d'hyphes du *P. ultimum* déposée directement sur le système racinaire de la plantule, n'est pas représentative d'une infection naturelle. L'inoculation des plantules par une suspension de propagules de ce champignon ou via un substrat pré-infecté auraient probablement été préférables, bien que ces méthodes ne nous aient pas donné des résultats satisfaisants lors d'essais préliminaires.

Outre le déploiement des mécanismes de défense des plantules de carottes endomycorhizées, d'autres observations intéressantes ont pu être révélées par l'utilisation de marqueurs cytochimiques et de la microscopie électronique à transmission. Il a été possible d'identifier la présence de deux hyphes du *P. ultimum* à l'intérieur d'une hyphe du *G. intraradices*, observation qui aurait été difficile sans l'usage d'un marqueur tel l'exoglucanase - or colloïdal qui s'associe à la cellulose et permet de différencier les hyphes du *P. ultimum* de celles du *G. intraradices*. Ce phénomène de mycoparasitisme n'est pas nouveau, puisqu'il a été observé à l'intérieur de spores de champignons endomycorhiziens depuis

plus de 80 ans (Lee et Koske 1994). Par contre, il s'agit de la première observation à l'intérieur des hyphes dans les racines. Dans leurs travaux, Rousseau *et al.* (1996) ont observé le mycoparasitisme des hyphes de la phase extramatricielle du *Glomus intraradices* par un isolat très virulent du *Trichoderma harzianum*. A notre connaissance, seuls Ross et Ruttencutter (1977) ont rapporté des hyphes d'un champignon similaire à *Pythium* (Pythium-like) parasitant des hyphes et des vésicules du *Glomus macrocarpum* dans des racines de soja.

Quelques espèces de *Pythium* agissent comme mycoparasites (Van der Plaats-Niterink 1981), mais le *Pythium ultimum* n'a jamais été mentionné comme possédant un tel rôle. Par contre, il est caractérisé par sa rapidité de croissance, son agressivité et sa capacité de produire plusieurs enzymes capables de dégrader les parois cellulaires (Campion 1997), ce qui en fait un bon candidat.

Finalement, à plusieurs reprises, nous avons observé des hyphes saines du *P. ultimum* (Benhamou *et al.* 1996) contiguës aux hyphes ou aux arbuscules du *G. intraradices* (Bonfante-Fasolo *et al.* 1991). Cette observation est inhabituelle car il est suggéré que la présence du champignon pathogène excluerait le champignon mycorhizien et *vice versa*. Par exemple, Mucojev *et al.* (1991) ont observé que les hyphes du *Fusarium solani* ne se retrouvaient pas dans les mêmes tissus que les hyphes du *Glomus macrocarpus*. Les auteurs ont postulé une interaction chimique (antibiose) ou physique pour expliquer de telles observations. Cordier *et al.* (1996), de leur côté, n'ont jamais noté la présence d'hyphes du *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* dans des tissus dont les cellules possédaient des arbuscules de *Glomus mosseae*. Nos résultats sont différents puisqu'il fût possible de rencontrer des hyphes du *P.ultimum* dans des cellules ou se trouvaient déjà des arbuscules. Il est possible que le *P. ultimum* soit plus agressif que le *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*. Il serait impératif de reproduire ce genre d'étude avec différentes interactions hôte - endomycorhize - pathogène avant de pouvoir généraliser le rôle qu'ont les champignons endomycorhizien.

CONCLUSION

En guise de synthèse, la microscopie électronique à transmission couplée à l'utilisation de marqueurs à l'or colloïdal - enzymes nous a permis d'observer le déploiement de quelques mécanismes de défense de la plante colonisée par un champignon EA. Cette méthode nous a aussi permis d'observer un cas possible de mycoparasitisme du *G. intraradices* par le *P. ultimum* et de suivre la progression contiguë des hyphes des deux champignons dans les mêmes cellules.

Bien que nous ne puissions affirmer que le *Glomus intraradices* diminue la flétrissure des semis par une induction du système de défense des plantules de carottes, en raison du manque de témoins comparatifs, les résultats obtenus dans cette étude nous fournissent certains indices dans ce sens et démontrent l'intérêt de poursuivre ces travaux. Les études ultérieures devront s'attarder à l'amélioration de la méthode d'inoculation du champignon pathogène pour obtenir des niveaux d'infection plus représentatifs des conditions naturelles. De plus, lors de l'arrosage, une attention particulière devrait être apportée pour empêcher la contamination par éclaboussure entre les traitements.

BIBLIOGRAPHIE

- Bendayan M (1981) Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 29: 531-541
- Bendayan M (1984) Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: A new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *J Electron Microscop Tech* 1: 349-372
- Benhamou N (1989) Preparation and application of lectin-gold complexes. In: MA Hayat (ed) *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*. Academic Press, New York, 95-143
- Benhamou N (1993) Ultrastructural detection of β -1,3-glucans in tobacco root tissues infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* using a gold-complexed tobacco β -1,3-glucanase. *Physiol Mol Plant Pathol* 41 :351-370
- Benhamou N, Bélanger RR, Paulitz TC (1996) Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f.sp. *psii* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 86: 1174-1185
- Benhamou N, Chamberland H, Ouellette GB, Pausé, FJ (1987) Ultrastructural localization of β -(1-4)D-glucans in two pathogenic fungi and in their host tissues by means of an exoglucanase-gold complex. *Can J Microbiol* 33 :405-417
- Benhamou N, Fortin JA, Hamel C, St-Arnaud M, Shatilla A (1994a) Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84 :958-968
- Benhamou N, Giboa-Garber N, Trudel J, Asselin A (1988) A new lectin-gold complex for ultrastructural localization of galacturonic acids. *J Histochem Cytochem* 36: 1403-1411
- Benhamou N, Grenier J, Asselin A, Legrand M (1989) Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell* 1: 1209-1221
- Benhamou N, Joosten MHAJ, De Witt PJGM (1990) Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* 92: 1108-1120
- Benhamou N et Thériault G (1992) Treatment with chitosan enhance resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 33-52

- Blee KA et Anderson AJ (1996) Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith. *Plant Physiol* 110 : 675-688
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL (1985) A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can J Bot* 63: 184-194
- Campion C (1997) Agressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *Eur J Plant Path* 103: 725-735
- Caron M (1989) Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can J Plant Pathol* 11: 177-179
- Caron M, Richard C, Fortin JA (1986c) Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on Fusarium crown rot and root rot on tomatoes. *Phytoprotection* 67 : 15-19
- Chamberland H, Charest PM, Ouellette GB, Pauze FJ (1985) Chitinase-gold complex used to ultrastructurally localize chitin in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, as compared with chitin specific-gold-conjugated lectins. *Histochem J* 17 (3) : 313-321
- Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR (1992a) Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 411-425
- Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1996) Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil* 185: 223-232
- Donner LW et Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol Tech* 5 : 25-28
- Dumas-Gaudot E, Furlan V, Grenier J, Asselin A (1992) New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 1 :133-136
- Frens G (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. *Nat Phys Sci* 241: 20-22
- Gianinazzi S (1991) Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas : cellular, biochemical and genetic aspects. *Agric Ecosyst Environ* 35 : 105-120
- Giovannetti M et Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84 : 489-500

- Grandmaison J, Olah GM, VanCalstere MR, Furlan V (1993) Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3 : 155-164
- Harrison MJ et Dixon RA (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 EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, London
- Kormanik PP et McGraw AC (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In : NC Schenck (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press, St-Paul MN. 37-45
- Lee P-J et Koske RE (1994) *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycol Res* 98: 458-466
- Morandi D, Bailey JA, Gianinazzi-Pearson V (1984) Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi *Physiol Plant Pathol* 24 : 357-364
- Muchojev JJ, Muchojev RMC, Goncalves EJ (1991) Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpus* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. 2. Temporal-spatial relationships. *Plant Soil* 132: 47-51
- Perrin R (1990) Interactions between mycorrhizae and disease caused by soil-borne fungi. *Soil Use Manage* 6: 189-195
- Ratti N, Alam M, Sharma S, Janardhanan KK (1998) Effects of *Glomus aggregatum* on lethal yellowing disease of Java citronella caused by *Pythium aphanidermatum*. *Symbiosis* 24: 115-126
- Rosendhal S (1985) Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathol Z* 114 : 31-40
- Ross JP et Ruttencutter R (1977) Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. *Phytopathology* 67: 490-496
- Rousseau A, Benhamou N, Chet I, Piché Y (1996) Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86: 434-443

- Simoneau P, Louisy-Louis N, Plenchette C, Strulu DG (1994) Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Appl Environ Microbiol* 60: 1810-1813
- Southernton SG et Deverall BJ (1990) Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recon* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 437-450
- 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
- St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA (1995a) Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. In: Fortin JA, Charest C, Piché Y (eds) La symbiose mycorrhizienne - État des connaissances. Éditions Orbis Frelighsburg, Québec. 51-87
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in a *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol Res* 100 : 328-332
- Sundaresan P, Ubalthoose Raja N, 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* 18: 291-301
- Van der Plaats-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus *Pythium*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
- Vian B, Brillonet JM, Satiat-Jeunemaître B (1983) Ultrastructural visualization of xylans in cell walls of hardwood by means by xylanase-gold complex. *Biol Cell* 49: 179-182
- Wyss P, Boller T, Wiekmen A (1989) Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric Ecosyst Environ* 29: 451-456
- Yao Konan M (1996) Influence de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance et le rendement de cultivars d'oignon (*Allium cepa* L.) soumis à différentes conditions culturales. Mémoire de maîtrise, Université Laval

TABLEAU

Tableau I. Colonisation par le *G. intraradices* et le *P. ultimum* des systèmes racinaires de plantules de carottes prélevés pour observation au MET

| Organisme | Colonisation moyenne |
|-------------------------------------|----------------------|
| | %* \pm ET |
| <i>P. ultimum</i> ¹ | 49.9 \pm 8.8 |
| <i>G. intraradices</i> ² | 81.7 \pm 3.4 |

*Ces valeurs sont la moyenne de 10 systèmes racinaires \pm l'erreur type.

¹ G+P+

² G+P- et G+P+

FIGURES

Légende des figures

Figure 1a-d. Coupes transversales d'une racine de carotte colonisée par le *G. intraradices* et infectée par le *P. ultimum* incubées avec un marqueur β -1,4-exoglucanase - or colloïdal permettant l'identification de la cellulose présente dans la membrane cytoplasmique du *P. ultimum* et de l'hôte. **a,b**, Hyphes du *P. ultimum* (Pu) et arbuscules du *G. intraradices* (Gi) contiguës dans la même cellule. **c,d**, Hyphe du *P. ultimum* possédant des vacuoles hypertrophiées (Va) et dont le plasmalemme est rétracté (PI); MCH = membrane cytoplasmique de l'hôte.

Figure 2a-d. Coupe transversale d'une racine de carotte colonisée par le *G. intraradices* et infectée par le *P. ultimum* incubée avec un marqueur β -1,4-exoglucanase - or colloïdal permettant l'identification de la cellulose présente dans la membrane cytoplasmique du *P. ultimum* et de l'hôte. **a**, Hyphe du *P. ultimum* à l'état de coquille pleiomorphe (Cp). **b**, Déposition de matériel, apposition pariétale (Ap), au niveau de la membrane cytoplasmique de l'hôte (MCH), dans une zone de pénétration d'une hyphe du *P. ultimum*. **c**, Hyphe du *G. intraradices* mycoparasitée par deux hyphes du *P. ultimum*. **d**, Pénétration d'une cellule de l'hôte par une hyphe du *P. ultimum*.

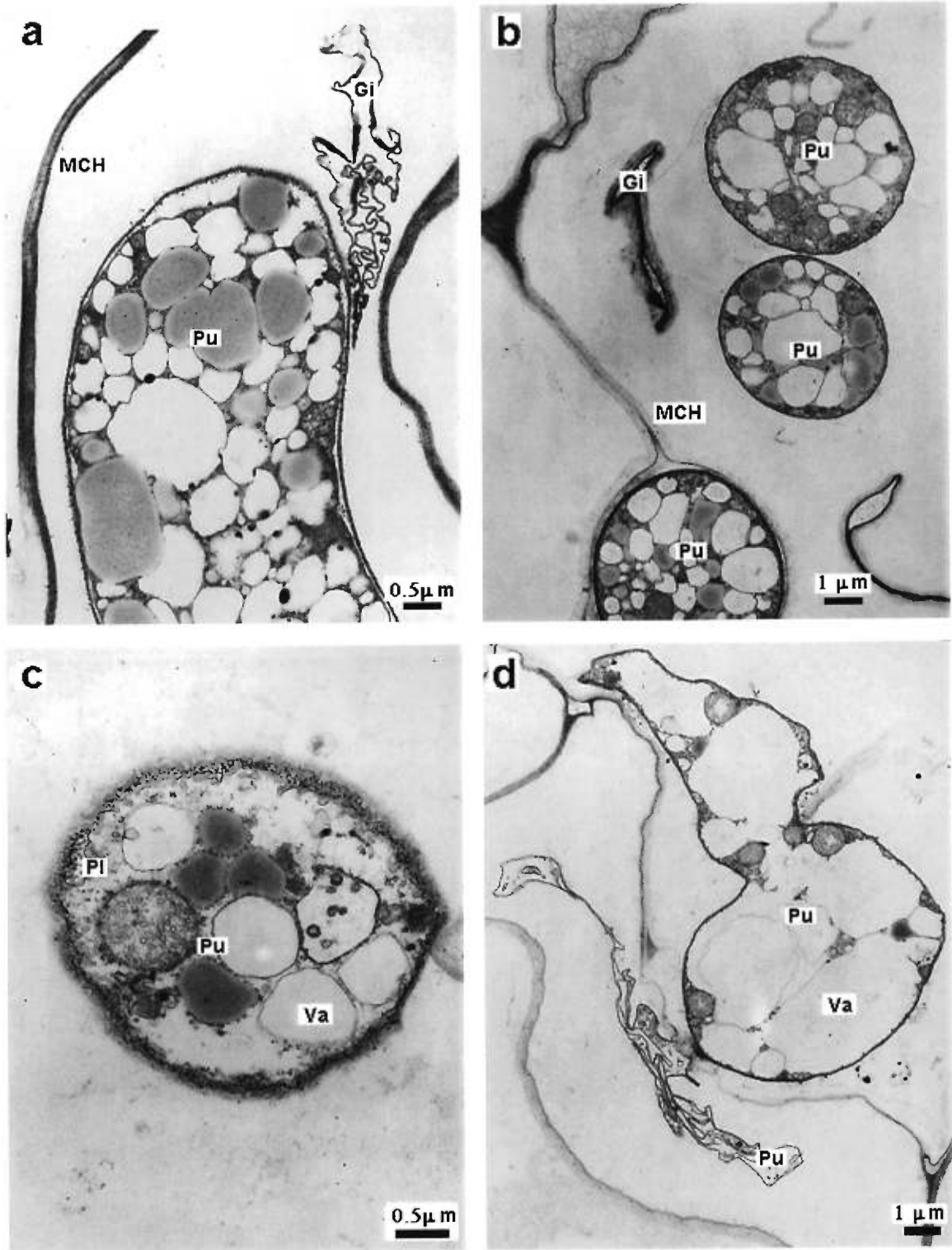


Figure 1.

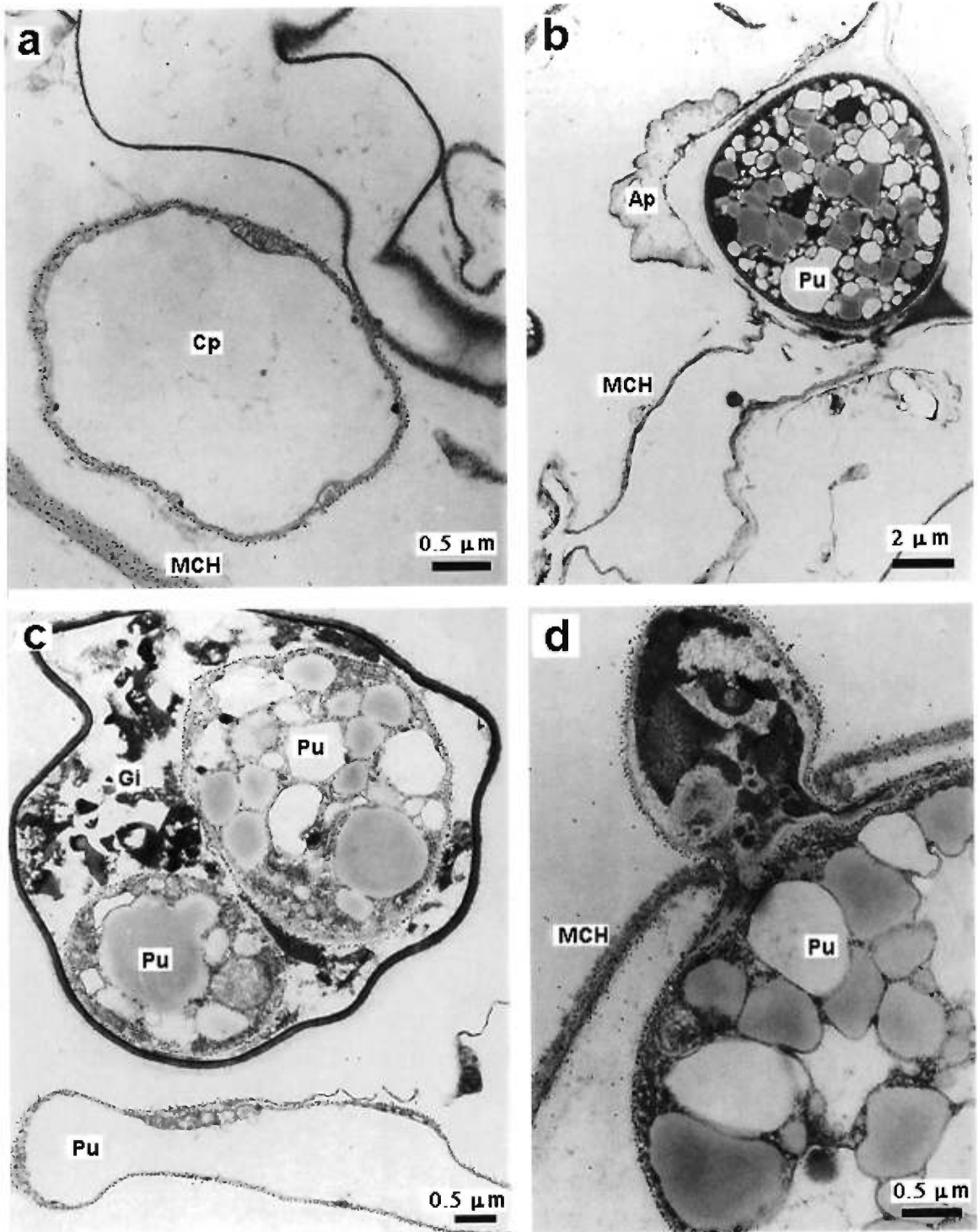


Figure 2.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le but de cette étude était de vérifier si le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* induisait le déploiement de mécanismes de défense chez les plantules de carottes lorsqu'elles étaient infectées par le *Pythium ultimum*. Avant de pouvoir démontrer cette hypothèse, plusieurs étapes (préliminaires) ont dû être franchies : 1) dans la mise au point d'une méthode pour produire de très jeunes plantules de carottes colonisées uniformément et rapidement par le champignon EA, en limitant la contamination par des champignons indésirables, 2) le choix d'un cultivar de carotte, d'un isolat de *Pythium* ainsi que d'une méthode d'inoculation du champignon pathogène pour obtenir des plantules de carottes infectées quelques jours seulement après l'inoculation par le parasite. La mise au point de ces méthodes était essentielle pour l'utilisation de la microscopie électronique à transmission couplée à l'utilisation de marqueurs à l'or colloïdal-enzymes, un outil qui permet la localisation de modifications cytochimiques dans les racines. Le travail au MET requiert le prélèvement de sections de 1 à 2 mm² de tissus et chacune de ces sections devait contenir les hyphes des deux champignons à l'étude pour que nous puissions visualiser les changements induits par leurs présences dans la plante hôte. De plus, aucun champignon indésirable (contaminant) ne devait interférer avec cette interaction car ces derniers auraient pu éliciter une réponse de défense de la part de la plante. Une attention particulière fût donc apportée pour remédier aux problèmes d'inoculum endomycorhizien contaminé.

1. Méthode de production des plantules endomycorhiziennes arbusculaires

La production de plantes endomycorhiziennes arbusculaires en utilisant la méthode traditionnelle qui consiste à faire croître des plantules à proximité d'un inoculum (segment de racines endomycorhizées ou d'hyphes intraracinaires, spores ou vésicules) nécessite plusieurs semaines pour atteindre une colonisation racinaire représentant 50% de la longueur totale du système

racinaire (Nantais 1997). Cette méthode usuelles pour produire des plantes colonisées par un champignon EA ne convenait pas à la présente étude puisque le champignon pathogène que nous voulions étudier cause une maladie sur les semis. Il fallait donc trouver une façon plus rapide pour produire des plantules endomycorhizées. La co-culture de semences avec des plants mères déjà colonisés par le *G. intraradices*, dans un substrat où le réseau d'hyphes extramatriciel est bien établi, représentait une alternative intéressante.

Brundrett *et al.* (1985) ont démontré que la co-culture permettait d'obtenir une colonisation du système racinaire de semis de poireaux avec formation d'arbuscules du *G. intraradices* après une semaine. Par contre, un des problèmes inhérents à la co-culture est l'utilisation de plants mères âgés de plusieurs mois, ce qui favorise la présence de champignons contaminants dans le sol et dans les racines. De plus, l'inoculum utilisé habituellement pour produire ces plants mères endomycorhiziens n'est pas produit en conditions aseptiques, ce qui augmente les risques d'obtenir une colonisation racinaire par des champignons indésirables (Abbott *et al.* 1981; Biermann et Linderman 1983; Menge 1984; Millner et Kitt 1992; Walker et Vestberg 1994).

Cette étude a démontré que les spores produites *in vitro* selon la méthode décrite par St-Arnaud *et al.* (1995) constituaient un inoculum approprié pour la colonisation endomycorhizienne de plantes mères et permettaient d'obtenir un niveau de colonisation comparable à celui généré par un inoculum de segments de racines, à condition qu'un substrat composé de sol, de Turface, de perlite et de mousse de tourbe soit utilisé (Vimard *et al.* 1999 et chapitre 1). L'utilisation d'un tel substrat s'est avérée essentielle pour apprécier la valeur de cet inoculum car dans un substrat composé exclusivement de Turface, aucune colonisation significative par les spores n'était obtenue. En raison de la granulométrie très grossière de ce type de substrat, les spores étaient peut-être perdues par lessivage avant qu'elles ne puissent germer ou les tubes germinatifs irrémédiablement endommagés ce qui prévenait la colonisation des plants. Il est aussi possible que ce substrat soit moins propice à l'établissement d'une microflore favorable et que les spores en germination soient plus sensibles que

les segments de racines à ce paramètre. Cette question n'étant pas au centre du sujet de ce mémoire, aucun effort n'a été fait pour vérifier ces hypothèses. De plus, il a été établi que l'inoculation des plants à l'aide de spores produites *in vitro* permettait d'obtenir des plants mères colonisés presque uniquement par le champignon à l'étude, alors que l'utilisation de segments de racines générerait une contamination considérable par d'autres champignons. Finalement, l'utilisation de ces plants mères colonisés par le champignon EA, mis en co-culture avec des semences de carottes, a permis la production de plantules ayant des niveaux de colonisation équivalents à ceux obtenus par Brundrett *et al.* (1985), mais plus jeunes et exempts de contamination fongique. Il faut noter, comme nous l'avons mentionné auparavant, que l'âge des plantules de carottes endomycorhizées représente un facteur critique dans notre étude, puisque nous travaillons sur une maladie des semis et que les plantules deviennent résistantes au parasite lorsque les cellules racinaires développent des parois secondaires (Hendrix et Cambell 1973). Ces différentes modifications des méthodes conventionnelles pour produire des plantules endomycorhizées ont mené à l'obtention d'un matériel fiable pour poursuivre nos expériences.

2. Essais d'infection par le champignon pathogène *P. ultimum*

Plusieurs méthodes sont décrites dans la littérature pour causer une infection pythienne en conditions expérimentales. L'efficacité de ces méthodes dépend de l'hôte utilisé, du substrat dans lequel se fait l'infection et de l'espèce à l'étude.

Une suspension mycélienne représente un inoculum que l'on peut facilement produire en grande quantité et qui se distribue facilement et relativement uniformément dans le substrat. Ce type d'inoculum pose cependant des limitations méthodologiques en regard du temps nécessaire pour que le mycélium croisse et entre en contact avec la plante hôte, il est donc préférable pour les études qui s'étalent sur une période plus longue. Par exemple, St-Arnaud *et al.* (1994) ont dû attendre 60 jours après l'infection pour obtenir une colonisation de 20% de la longueur racinaire par le *P. ultimum* sur des tagètes. Lors de nos

essais avec une suspension mycélienne de *P. ultimum* et *P. violae* 3-25 et 3-28, aucune infection n'a pu être observée dans le système racinaire des plantules de carottes 10 jours après l'inoculation. Cette méthode d'inoculation n'a donc pas été retenue puisque le temps représente un facteur limitant pour l'interaction à l'étude.

Les essais avec un inoculum composé de sol infesté par le *P. ultimum* ont donné une très faible infection du système racinaire des carottes après 14 jours. Ces résultats sont différents de ceux observés par Mandelbaum et Hadar (1997) sur le concombre dans un sol infesté par le *Pythium aphanidermatum*. Les raisons pouvant expliquer ces variations par rapport à leur résultats résident probablement dans les modifications que nous avons dû effectuer pour répondre aux exigences de l'interaction à l'étude. Le type de substrat, le stade de développement de l'hôte lors de l'inoculation ainsi que les espèces confrontées ont été changés, ce qui a sûrement contribué à diluer l'efficacité des propagules du *Pythium*. Puisque cette méthode d'inoculation n'a pas donné les résultats escomptés, il a fallu en élaborer une autre.

L'utilisation d'une pastille de gélose recouverte du *P. ultimum* en pleine croissance s'est avérée la méthode d'inoculation la plus efficace lors des essais préliminaires pour l'interaction à l'étude. Le contact direct des hyphes du *Pythium* avec le système racinaire des plantules de carottes a permis une infection rapide et en plusieurs points sur les racines, menant à la production de plants infectés rapidement et uniformément, deux caractéristiques essentielles pour l'utilisation du MET. Les chercheurs utilisant les techniques relatives à la microscopie électronique à transmission (Chérif *et al.* 1992a; Rey *et al.* 1998) ou à balayage (Zamski et Peretz 1995) ont opté eux aussi pour cette méthode d'inoculation. Une fois la méthode d'inoculation sélectionnée, il fût possible de choisir les conditions optimales pour produire des plantules de carottes colonisées uniformément à la fois par le champignon endomycorhizien et le champignon pathogène. Le cultivar de carotte Caro-choice avec sa sensibilité intermédiaire au *P. ultimum* N1 permet l'obtention de racines avec une forte colonisation de ce

champignon sans qu'il n'y ait macération des tissus comme il fût noté avec les autres cultivars à notre disposition.

3. Observations au MET

Malgré les tests préliminaires effectués pour contrôler l'infection pythienne (rapportés en détail au chapitre 2), nous avons obtenu une agression plus forte que prévu par le parasite lors de l'expérience menant à l'échantillonnage final. Les racines des plantes témoins infectées par le *P. ultimum* mais sans le *G. intraradices* étaient déjà dans un état avancé de macération au premier prélèvement (24 heures). De plus, tous les traitements non-inoculés par le *P. ultimum* ont été contaminés par le parasite. Nos observations ont donc dû être limitées aux plantes ayant été inoculées par le *G. intraradices* et le *P. ultimum*.

Dans ces échantillons, les deux champignons se développaient de façon adjacente dans les mêmes cellules sans signe d'altération cellulaire. Par contre, à plusieurs reprises nous avons identifié des hyphes du *P. ultimum* montrant des signes de dommages (vacuolisation, coquilles pléiomorphiques) comme l'ont observé Benhamou *et al.* (1994) dans leur travaux *in vitro*. Les symptômes observés sur les hyphes du *P. ultimum* indiquèrent un phénomène fongitoxique causé par la production de métabolites secondaires comme les composés phénoliques et les phytoalexines (Benhamou *et al.* 1994). Il est bien connu que ces métabolites ont le potentiel de modifier le métabolisme fongique et d'interférer avec la synthèse enzymatique (Southern et Deverall 1990).

De plus, la présence d'une apposition pariétale fut observée au niveau d'un point de pénétration. Cette observation suggère que le champignon EA aurait stimulé la défense naturelle de la plante, puisqu'une telle observation n'a jamais été rapportée auparavant dans des racines qui n'avait pas été préalablement sensibilisées par un agent abiotique ou biotique (Chérif *et al.* 1992; Benhamou *et al.* 1994).

L'utilisation d'un marqueur exoglucanase - or colloïdal a permis de différencier facilement les hyphes des deux champignons et d'observer pour la première fois

un phénomène de mycoparasitisme du *P. ultimum* sur un champignon endomycorhizien à l'intérieur d'une racine. Rousseau *et al.* (1996) avaient observé un phénomène de mycoparasitisme dans des hyphes extramatriciellees du *G. intraradices* par le *Trichoderma harzianum*.

Le manque de témoin comparatif limite la portée de nos observations, par contre la rapidité avec laquelle ces changements ont été observé (24 heures), suggère que la colonisation des plantules de carottes par un champignon EA a joué un rôle de sensibilisation des tissus racinaires et aurait ainsi contribué à réprimer le développement du *P. ultimum*. Les résultats obtenus dans cette étude, sur un système de plantes entières *in vivo*, appuient les observations présentées par Benhamou *et al.* (1994) sur un système de racines transformées *in vitro*.

CONCLUSION

Cette étude fût la première à utiliser un inoculum de spores produites *in vitro* pour inoculer des plantes avec un champignon endomycorhizien arbusculaire. De plus, cet inoculum s'est avéré supérieur à ceux utilisés habituellement, car il est facile à produire dans un espace restreint et il permet l'obtention de plantes colonisées uniquement par le champignon à l'étude.

Parmi les différentes méthodes évaluées pour inoculer le *P. ultimum* dans les racines des plantules de carottes, l'utilisation d'une pastille de gélose recouverte du champignon en pleine croissance fût la seule méthode efficace, considérant les contraintes relatives à cette étude. Néanmoins, les problèmes rencontrés lors de l'expérimentation finale démontrent que cette méthode n'est pas idéale et est relativement variable. Une méthode plus précise devra être élaborée ultérieurement, afin de mieux contrôler l'infection pythienne.

Les observations obtenues au MET appuient l'hypothèse que le *G. intraradices* puisse éliciter les mécanismes de défense dans les plantules de carottes. Ces résultats sont préliminaires et d'autres expériences devront être menées pour confirmer nos observations. De plus d'autres combinaisons de

plante hôte-parasite devront être étudiées afin de pouvoir généraliser le rôle du *G. intraradices* et des autres champignons EA sur la résistance accrue des plantes aux maladies.

La multiplicité d'action que possèdent les champignons EA en font des candidats de choix comme agent de lutte biologique. En effet, si le champignon mycorhizien arbusculaire participe effectivement à la protection des plantes contre l'infection pathogénique par l'induction des mécanismes de défense de la plante, tel que suggéré par nos résultats, il joue aussi un rôle actif en modifiant la distribution des microorganismes dans la mycorhizosphère. De plus, les champignons EA améliorent la croissance des plantes en favorisant l'absorption d'éléments essentiels. Le champignon endomycorhizien arbusculaire représente donc un agent biologique prometteur pour diminuer l'utilisation de pesticides dans l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Abbott, LK et Robson AD (1981) Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: Effect of inoculum type. *Aust J Agric Res* 32: 631-639
- Ames RN et Linderman RG (1978) The growth of easter lily (*Lilium longiflorum*) as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Fusarium oxysporum*, and fertility level. *Can J Bot* 56: 2773-2780
- Ames RN, Reid CPP, Ingham ER (1984) Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol* 96: 555-563
- An ZQ et Hendrix JW (1988) Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261
- Anderson-Pouty AJ et Albersheim P (1975) Host-pathogen interactions. VIII. Isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiol* 56: 286-291
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1998) Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant Soil* 202 : 89-96
- Andrade G, Mihara KL, Linderman RG, Bethlenfalvay GJ (1997) Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 192: 71-79
- Azcon-Aguilar C et Bago B (1994) Physiological characteristics of the host plant promoting an undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. In: Gianinazzi S, Schuepp, H. (eds) *Impact of arbuscular mycorrhizas in sustainable agriculture and natural ecosystems*. Verlag Birkhäuser, Basel, 47-60
- Bansal B et Mukerji KG (1994) Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. *Mycorrhiza* 5: 39-44
- Barber MS, Bertram RE, Ride JP (1989) Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol Mol Plant Pathol* 34: 3-12
- Bécard G et Fortin JA (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* 108: 211-218
- Benard D et Punja ZK (1995) Role of *Pythium* species in cavity spot development on carrots in British Columbia. *Can J Plant Pathol* 17: 31-45

- Bendayan M (1981) Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme-gold complexes. *J Histochem Cytochem* 29: 531-541
- Bendayan M (1984) Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: A new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. *J Electron Microscop Tech* 1: 349-372
- Benhamou N (1989) Preparation and application of lectin-gold complexes. In: MA Hayat (ed) *Colloidal Gold, Principles, Methods and Applications*. Academic Press, New York, 95-143
- Benhamou N (1993) Ultrastructural detection of β -1,3-glucans in tobacco root tissues infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* using a gold-complexed tobacco β -1,3-glucanase. *Physiol Mol Plant Pathol* 41 :351-370
- Benhamou N (1995) Mécanismes cellulaires et biochimiques de la résistance aux maladies racinaires. Dans: Fortin JA, Charest C., Piché Y. (eds) *La symbiose mycorrhizienne: État des connaissances*. Éditions Orbis, Frelighsburg, Canada, 89-107
- Benhamou N (1996) Pre-inoculation of Ri T-DNA-transformed pea roots with *Pseudomonas fluorescens* inhibits colonization by *Pythium ultimum* Trow: an ultrastructural and cytochemical study. *Planta* 199: 105-117
- Benhamou N, Bélanger RR, Paulitz TC (1996) Induction of differential host responses by *Pseudomonas fluorescens* in Ri T-DNA-transformed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisii* and *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 86: 1174-1185
- Benhamou N, Chamberland H, Ouellette GB, Pauzé, FJ (1987) Ultrastructural localization of β -(1-4)D-glucans in two pathogenic fungi and in their host tissues by means of an exoglucanase-gold complex. *Can J Microbiol* 33 :405-417
- Benhamou N, Fortin JA, Hamel C, St-Arnaud M, Shatilla A (1994a) Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology* 84 958-968
- Benhamou N, Giboa-Garber N, Trudel J, Asselin A (1988) A new lectin-gold complex for ultrastructural localization of galacturonic acids. *J Histochem Cytochem* 36: 1403-1411
- Benhamou N, Grenier J, Asselin A, Legrand M (1989) Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *Plant Cell* 1: 1209-1221

- Benhamou N, Joosten MHAJ, De Witt PJGM (1990) Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* 92: 1108-1120
- Benhamou N, Lafontaine P, Nicole M (1994b) Induction of systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology* 84: 1432-1444
- Benhamou N et Thériault G (1992) Treatment with chitosan enhance resistance of tomato plants to the crown and root rot pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 33-52
- Biermann B et Linderman RG (1983a) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol* 95: 97-105
- Biermann B et Linderman RG (1983b) Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular-arbuscular mycorrhizae. *J Am Soc Hortic Sci* 108: 962-971
- Bishop PD, Pearce G, Bryant G, Ryan CA (1981) Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell walls. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3536-3540
- Blee KA et Anderson AJ (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-Fasolo P, Tamagnone L, Peretto R, Esquerré-Tugayé MT, Mazau D, Mosiniak M, Vian B (1991) Immunocytochemical location of hydroxyproline rich glycoproteins at the interface between a mycorrhizal fungus and its host plants. *Protoplasma* 165: 127-138
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL (1985) A developmental study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Can J Bot* 63: 184-194
- Calvet C, Pinochet J, Camprubi A, Fernández C (1995) Increased tolerance to the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* in mycorrhizal micropropagated BA-29 quince rootstock. *Mycorrhiza* 5: 253-258
- Calvet C, Camprubi A, Rodriguez-Kabana R (1996) Inclusion of arbuscular mycorrhizal fungi in alginate film for experimental studies and plant inoculation. *Hortscience* 31: 285

- Camel SB, Reyes-Solis MG, Ferrera-Cerrato R, Franson RL, Brown MS, Bethlenfalvai GJ (1991) Growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium through bulk soil. *Soil Sci Soc Am J* 55: 389-393
- Campion C (1997) Aggressiveness and production of cell-wall degrading enzymes by *Pythium violae*, *Pythium sulcatum* and *Pythium ultimum*, responsible for cavity spot on carrots. *Eur J Plant Pathol* 103: 725-735
- Caron M (1989) Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases. *Can J Plant Pathol* 11: 177-179
- Caron M, Fortin JA, 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 JA, Richard C (1986a) Effect of *Glomus intraradices* on infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes over a 12-week period. *Can J Bot* 64: 552-556
- Caron M, Fortin JA, Richard C (1986b) Effect of phosphorus concentration and *Glomus intraradices* on *Fusarium* crown and root rot of tomatoes. *Phytopathology* 76: 942-946
- Caron M, Richard C, Fortin JA (1986c) Effect of preinfestation of the soil by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, on *Fusarium* crown rot and root rot on tomatoes. *Phytoprotection* 67 : 15-19
- Chamberland H, Charest PM, Ouellette GB, Pauze FJ (1985) Chitinase-gold complex used to ultrastructurally localize chitin in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, as compared with chitin specific-gold-conjugated lectins. *Histochem J* 17 (3) : 313-321
- Chérif M, Benhamou N, Menzies JG, Bélanger RR (1992a) Silicon induced resistance in cucumber plants against *Pythium ultimum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 411-425
- Chérif M, Menzies JG, Benhamou N, Bélanger R (1992b) Studies of silicon distribution in wounded and *Pythium ultimum* infected cucumber plants. *Physiol Mol Plant Pathol* 41: 371-385
- Cook RJ (1982) Progress toward biological control of plant pathogens, with special reference to take-all of wheat. *Agr For Bul* 5: 22-30
- Cordier C, Gianinazzi S, Gianinazzi-Pearson V (1996) Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant and Soil* 185: 223-232

- Curtis H (1983) *Biology*. Worth, New York.
- Dassi B, Dumas-Gaudot E, Asselin A, Richard C, Gianinazzi S (1996) Chitinase and β -1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *Eur J Plant Pathol* 102: 105-108
- Datnoff LE, Nemecek S, Pernezny K (1995) Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. *Biological control* 5: 427-431
- Davis KR, Darvill AG, Albersheim P (1986) Host-pathogen interactions. XXXI. Several biotic and abiotic elicitors act synergistically in the induction of phytoalexin accumulation in soybean. *Plant Mol Biol* 6: 23-32
- Davis RM et Menge JA (1980) Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of Citrus. *Ecology and Epidemiology* 70: 447-452
- Davis RM, Menge JA, Erwin DC (1979) Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on Verticillium wilt of cotton. *Phytopathology* 69: 453-456
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C (1996) *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. *Mycol Res* 100: 1237-1242
- Dehne HW (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 1115-1119
- Dehne H-W et Schönbeck F (1979) The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. II. Phenolmetabolism and lignification. *Phytopath Z* 95: 210-216
- Diop TA, Plenchette C, Strullu DG (1994) Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. *Mycorrhiza* 5: 17-22
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32: 479-501
- Donner LW et Bécard G (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotechnol Tech* 5 : 25-28
- Draper NR et Smith H (1981) *Applied regression analysis*. Wiley, New-York.

- Dumas E, Tahiri-Alaoui A, Gianinazi S, Gianinazzi-Pearson V (1989) Observations on modifications in gene expression with VA endomycorrhiza development in tobacco: qualitative and quantitative changes in protein profiles. *Endocytobiology IV*: 153-157
- Dumas-Gaudot E, Furlan V, Grenier J, Asselin A (1992) New acidic chitinase isoforms induced in tobacco roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza 1*: 133-136
- Estaun E, Calvet C, Camprubi A (1994) Arbuscular mycorrhizae and growth enhancement of micropropagated Prunus root stock in different soilless potting mixes. *Agr Sci Finland 3*: 263-267
- Ferguson JJ et Woodhead SH (1982) Increase and maintenance of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Schenck NC (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press, St Paul, MN, 47-54
- Filion M (1998) Interactions mycorrhizosphériques entre un champignon endomycorhizien arbusculaire (*Glomus intraradices*) et différents micro-organismes édaphiques. Mémoire de maîtrise Université de Montréal
- Fortin JA, St-Arnaud M, Hamel C, Chavarie C, Jolicoeur M (1996) Aseptic *in vitro* endomycorrhizal spore mass production. US Patent Number 5,554,530
- Frens G (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. *Nat Phys Sci 241*: 20-22
- Garcia-Garrido JM et Ocampo JA (1988) Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytol 110*: 551-555
- Garcia-Garrido JM et Ocampo JA (1989) Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biol Biochem 21*: 165-167
- Gaunt RE (1978) Inoculation of vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi on onions and tomato seeds. *NZ J Bot 16*: 69-71
- Gianinazzi S (1991) Vesicular-arbuscular (endo-) mycorrhizas : cellular, biochemical and genetic aspects. *Agric Ecosyst Environ 35* : 105-120
- Gianinazzi-Pearson V, Dumas-Gaudot E, Golotte A, Tahiri-Alaoui A, Gianinazzi P (1996) Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol 133*: 45-57

- Gianinazzi-Pearson V, Morandi D, Dexheimer J, Gianinazzi S (1981) Ultrastructural and ultracytochemical features of a *Glomus tenuis* mycorrhiza. *New Phytol* 88: 633-639
- Gilmore AE (1968) Phycomycetous mycorrhizal organisms collected by open-pot culture methods. *Hilgardia* 39: 87-105
- Giovannetti M et Hepper CM (1985) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in *Hedysarum coronarium* and *Onobrychis viciifolia*: host-endophyte specificity. *Soil Biol Biochem* 17: 899-900
- Giovannetti M et Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84 : 489-500
- Graham JH et Menge JA (1982) Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil phosphorus on take-all disease of wheat. *Phytopathology* 72: 95-98
- Grandmaison J, Olah GM, Van Calsteren MR, Furlan V (1993) Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164
- Hammerschmidt R et Dann EK (1997) Induced resistance to disease. Dans: Rechcigl NA, Rechcigl, JE (eds) Environmentally safe approaches to crop disease control. CRC Press, Boca Raton, 177-198
- Harrison MJ et Dixon RA (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
- Hendrix FF et Cambell WA (1973) Pythiums as plant pathogens. *Annu Rev Plant Phytopathol* 11: 77-98
- Hewitt EJ (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, London
- Holley JD et Peterson RL (1979) Development of a vesicular-arbuscular mycorrhiza in bean roots. *Can J Bot* 57: 1960-1978
- Howard RJ, Pratt RG, Williams PH (1978) Pathogenicity to carrots of *Pythium* species from organic soils of North America. *Phytopathology* 68: 1293-1296
- Hung L-L et Sylvia DM (1988) Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl Environ Microbiol* 54: 353-357

- Hussey RS et Roncadori RW (1982) Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematod activity and improve plant growth. *Plant Disease* 66: 9-14
- Keen NT et Yoshikawa M (1983) β -1,3-Endonuclease from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls. *Plant Physiol* 71: 460-465
- Koide RT et Schreiner RP (1992) Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 557-581
- Kombrink E, Schroder M, Hahlbrock K (1989) Several "pathogenesis-related" proteins in potato are β -1,3-glucanases and chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 782-785
- Kormanik PP et McGraw AC (1982) Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. Dans : NC Schenck (ed) *Methods and Principles of Mycorrhizal Reseach*. APS Press, St-Paul MN. 37-45
- Krisna KR et Bagyaraj DJ (1982) Interaction between *Glomus fasciculatum* and *Sclerotium rolfsii* in peanut. *Can J Bot* 61: 2349-2351
- Kúc J (1987) Translocated signals for plant immunization. *Ann NY Acad Sci* 94: 221-223
- Laiho O (1970) *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta Forest Fenni* 106: 1-13
- Lambais M et Mehdy MC (1995) Differential expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can J Bot* 73: S533-S540
- Lee P-J et Koske RE (1994) *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycol Res* 98: 458-466
- Lehmann, E. 1975. *Nonparametrics - Statistical Methods Based on Ranks*. Holden-Day series in probability and statistics, Holden-Day. Oakland, CA.
- Le Tacon F et Selosse M-A (1994) La place des symbioses mycorrhiziennes dans l'évolution et la colonisation des continents par la vie. *Acta Bot Gallica* 141: 405-419
- Liu R-J (1995) Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on *Verticillium* wilt of cotton. *Mycorrhiza* 5: 293-297
- Lovato PE, Schuepp H, Trouvelot A, Gianinazzi S (1995) Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchard and ornamental plants. Dans: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 443-467

- Mandelbaum R et Hadar Y (1997) Methods for determining *Pythium* suppression in container media. *Compost Sci & Util* 5: 15-22
- Marx DH et Daniel WJ (1976) Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can J Microbiol* 22: 338-341
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol* 87: 325-333
- Mazau D et Esquerré-Tugayé MT (1986) Hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation in the cell walls of plants infected by various pathogens. *Physiol Mol Plant Pathol* 29: 147-157
- Meera MS, Shivanna MB, Kageyama K, Hyakumachi M (1994) Plant growth promoting fungi from zoysiagrass rhizosphere as potential inducers of systemic resistance in cucumbers. *Phytopathology* 84: 1399-1406
- Mellano HM, Munnecke DE, Endo RM (1970) Relationship of seedling age to development of *Pythium ultimum* on roots of *Antirrhinum majus*. *Phytopathology* 60: 935-942
- Menge JA (1984) Inoculum production. Dans: Powell CL, Bagyaraj DJ (eds) VA Mycorrhiza. CRC Press, FL, pp 187-203
- Meyer J et Dehne H-W (1986) The influence of VA mycorrhizae on biotrophic leaf pathogens. Dans: Institut National de la Recherche Agronomique (ed), Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon 1-5 juillet 1985, 781-786
- Meyer JR et Linderman RG (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 RM et Jastrow JD (1992) The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Dans: Bethlenfalvay GJ, Linderman, R.G. (eds) Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA publisher, Madison, 29-44
- Millner PD et Kitt DG (1992) The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 9-15
- Morandi D, Bailey JA, Gianinazzi-Pearson V (1984) Isoflavonoid accumulation in soybean roots infected with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Physiol Plant Pathol* 24: 357-364

- Morton JB et Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominaea and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon* 37: 471-491
- Mosse B (1962) The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J Gen Microbiol* 27: 509-520
- Mosse B et Thompson JP (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. *Can J Bot* 62: 1523-1530
- Muchojev JJ, Muchojev RMC, Goncalves EJ (1991) Effect of kind and method of fungicidal treatment of bean seed on infections by the VA mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpus* and by the pathogenic fungus *Fusarium solani*. 2. Temporal-spatial relationships. *Plant Soil* 132: 47-51
- Mugnier J et Mosse B (1987) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77:1045-1050
- Nantais LM (1997) Optimization of arbuscular mycorrhizal inoculum through selection and increased production of *Glomus intraradices* propagules. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal
- Nemec S, et Myhre D (1984) Virus-*Glomus etunicatum* interactions in citrus rootstocks. *Plant Disease* 68: 311-314
- Niemira BA, Hammerschmidt R, Safir GR (1996) Postharvest suppression of potato dry rot (*Fusarium sambucinum*) in pre-nuclear minitubers by arbuscular mycorrhizal fungal inoculum. *American Potato Journal* 73: 509-515
- Norman JR (1996) Arbuscular mycorrhizal fungal-induced alteration to root architecture in strawberry and induced resistance to the root pathogen *Phytophthora fragaria*. *Plant and Soil* 185: 191-198
- Papavizas GC et Lumsden RD (1980) Biological control of soil borne fungal propagules. *Annu Rev Phytopathol* 18: 389-413
- Perrin R (1990) Interactions between mycorrhizae and disease caused by soil-borne fungi. *Soil Use Manage* 6: 189-195

- Peterson RL et Bradbury SM (1995) Use of plant mutants, intraspecific variants and non-hosts in studying mycorrhiza formation and function. Dans: Varma AK et Hock B (eds) *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 157-180
- Pinochet J, Calvet C, Camprubi A, Fernández C (1995) Interaction between the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal association of *Glomus intraradices* and Santa Lucia 64 cherry rootstock. *Plant and Soil* 170: 323-329
- Pironzynski KA et Malloch DW (1975) The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *BioSystems* 6: 153-164
- Plenchette C, Declerck S, Diop TA, Strullu DG (1996) Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot roots. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 545-548
- Powell CL (1976) Development of mycorrhizal infections from *Endogone* spores and infected root segments. *Trans Br Mycol Soc* 66: 439-445
- Rafin C et Tirilly Y (1995) Characteristics and pathogenicity of *Pythium* spp. associated with root rot of tomatoes in soilless culture in Brittany, France. *Plant Pathol* 44: 779-785
- Ratti N, Alam M, Sharma S, Janardhanan KK (1998) Effects of *Glomus aggregatum* on lethal yellowing disease of Java citronella caused by *Pythium aphanidermatum*. *Symbiosis* 24: 115
- Redecker D, Thierfelder H, Werner D (1995) A new cultivation system for arbuscular mycorrhizal fungi on glass beads. *Angew Bot* 69: 189-191
- Rempel CB (1989) Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizae (VAM) and fungal pathogens in wheat. Mémoire de maîtrise, Université du Manitoba
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Hass K (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci* 91: 11841-11843
- Rey P, Benhamou N, Tirilly Y (1998) Ultrastructural and cytochemical investigation of asymptomatic infection by *Pythium* spp. *Phytopathology* 88: 234-244
- Rosendhal S (1985) Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathol Z* 114 : 31-40

- Rosendahl CN 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
- Rosewarne GM, Barker SJ, Smith SE (1997) Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. *Mycol Res* 101: 966-970
- Ross JP et Ruttencutter R (1977) Population dynamics of two vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi and the role of hyperparasitic fungi. *Phytopathology* 67: 490-496
- Rousseau A, Benhamou N, Chet I, Piché Y (1996) Mycoparasitism of the extramatrical phase of *Glomus intraradices* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 86: 434-443
- SAS Institute Inc. 1992. The SAS System for Windows 3.10, release 6.08. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- 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
- Schrandt J (1994) Host range and influence of nutrition, temperature, and pH on growth of *Pythium violae* from carrot. *Plant Dis* 78: 335-338
- Schubert A, Mazzitelli M, Ariusso O, Eynard I (1990) Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevine: Influence of endophyte strain, P fertilization and growth medium. *Vitis* 29: 5-13
- Secilia J et Bagyaraj DJ (1987) Bacterial and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Can J Microbiol* 33: 1069-1073
- Shatilla A (1995) Phenylalanine ammonia-lyase activity in mycorrhizal and non-mycorrhizal Ri T-DNA transformed carrot roots. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal
- Simon L, Bousquet J, Lévesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Simoneau P, Louisy-Louis N, Plenchette C, Strulu DG (1994) Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Appl Environ Microbiol* 60: 1810-1813

- Smith GS (1988) The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi. *Phytopathology* 78: 371-374
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V, Koide R, Cairney JWG (1994) Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant and Soil* 159: 103-113
- Smith SE et Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London
- Smith SE, Robson AD, Abott LK (1992) The involvement of mycorrhizas in assessment of genetically dependent efficiency of nutrient uptake and use. *Plant Soil* 146: 169-179
- Southernton SG et Deverall BJ (1990) Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recon* f. sp. *tritici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 437-450
- Spanu P, Boller T, Ludwig A, Wiemken A, Faccio A, Bonfante-Fasolo P (1989) Chitinase in roots of mycorrhizal *Allium porrum*: regulation and localization. *Planta* 177: 447-455
- Stanghellinni ME et Hancock JG (1971) The sporangium of *Pythium ultimum* as a survival structure in soil. *Phytopathology* 61: 157-164
- St-Arnaud M, Hamel C, Caron M, Fortin JA (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, Fortin JA (1995a) Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. Dans: Fortin JA, Charest C, Piché Y (eds) *La symbiose mycorrhizienne - État des connaissances*. Éditions Orbis Publishing Frelighsburg, Québec, 51-87
- St-Arnaud M, Hamel C, Vimard B, Caron M, Fortin JA (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, Fortin JA (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in a *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol Res* 100 : 328-332

- Stephens CT, Powell CC, Schmitthenner AF (1981) A method of evaluating postemergence damping-off pathogens of bedding plants. *Phytopathology* 71: 1225-1228
- Strullu D-G et Plenchette C (1990) Encapsulation de la forme intraracinaire de *Glomus* dans l'alginate et l'utilisation des capsules comme inoculum. *C R Acad Sci Paris*, t. 310, Série III: 447-452
- Sylvia DM et Hubbell DH (1986) Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259-267
- Sylvia DM et Schenck NC (1983) Application of superphosphate to mycorrhizal plants stimulates sporulation of phosphorus-tolerant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 95: 655-661
- Sylvia DM et Sinclair WA (1981) A proposed role for low level antibiotic activity of an ectomycorrhizal fungus. *Phytopathology* 71: 260
- Sundaresan P, Ubalthouse Raja N, 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* 18: 291-301
- Tester M, Smith FA, Smith SE (1987) The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Can J Bot* 65: 419-431
- Tisdale JM et Oades JM (1982) Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J Soil Sci* 33: 141-163
- Tommerup IC (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans Br Mycol Soc* 81: 37-45
- Trotta A, Varese GC, Gnani E, Fusconi A, Sampo S, Berta G (1996) Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant and Soil* 185: 199-209
- Tsantrizos YS, Kope HH, Fortin JA, Ogilvie KK (1991) Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30: 1113-1118
- Van der Plaats-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus *Pythium*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn
- Vian B, Brillonet JM, Satiat-Jeunemaître B (1983) Ultrastructural visualization of xylans in cell walls of hardwood by means of xylanase-gold complex. *Biol Cell* 49: 179-182

- Vimard B, St-Arnaud M, Furlan V, Fortin JA (1999) Colonization potential of *in vitro*-produced arbuscular mycorrhizal fungus spores as compared with a root-segment inoculum from open pot culture. *Mycorrhiza* 8: 335-338
- Volpin H, Elkind Y, Okon Y, 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 DA, Okon Y, Kapulnik Y (1995) Suppression of an isoflavonoid phytoalexin defense response in mycorrhizal alfalfa roots. *Plant Physiol* 108: 1449-1454
- Walker CM et Trappe JM (1993) Names and epithets in the Glomales and Endogonales. *Mycol Res* 97: 339-344
- Walker C et Vestberg M (1994) A simple and inexpensive method for producing and maintaining closed pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. *Agr Sci Finland* 3: 233-240
- Warner A, Mosse B (1980) Independent spread of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Trans Br Mycol Soc* 74: 407-410
- Wyss P, Boller T, Wiekman A (1989) Glyceollin production in soybean during the process of infection by *Glomus mosseae* and *Rhizoctonia solani*. *Agric Ecosyst Environ* 29: 451-456
- Yao Konan M (1996) Influence de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance et le rendement de cultivars d'oignon (*Allium cepa* L.) soumis à différentes conditions culturales. Mémoire de maîtrise, Université Laval
- Zambolin L et Schenck Nc (1983) Reduction of the effects of pathogenic root-infecting fungi on soybean by the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Phytopathology* 73: 1402-1405
- Zamski E et Peretz I (1995) Cavity spot of carrots: interactions between the host and pathogen, related to the cell wall. *Ann. Appl. Biol.* 127: 23-32

ANNEXE 1

Protocole pour préparer la résine WPE 145

| | | | | | |
|---------------------|---------|---------|----------|----------|----------|
| Epon 812 | 2.50 g | 5.00 g | 10.00 g | 20.00 g | 30.00 g |
| DDSA ¹ | 0.80 g | 1.60 g | 3.20 g | 6.40 g | 9.60 g |
| NMA ² | 1.55 g | 3.10 g | 6.20 g | 12.40 g | 19.00 |
| DMP-30 ³ | 0.08g | 0.15 g | 0.30 g | 0.60 g | 0.90 g |
| Volume final | 3.75 ml | 7.50 ml | 15.00 ml | 30.00 ml | 45.00 ml |

¹Dodecyl succinique anhydride

²Nadic methyl anhydride

³Tri-(Diméthylaminométhyl) phénol

JBEM Services Pointe-Claire, BP 693, Dorval, Québec

Mélanger EPON 812, DDSA et NMA dans un b cher de polypropylène avec un agitateur magnétique pendant deux minutes. Vérifier que l'agitation ne soit pas trop forte pour qu'il n'y ai pas de bulles. Ajouter le DMP-30 et agiter encore deux minutes.

ANNEXE 2

Analyse de sol du champ de poireaux utilisé pour préparer le substrat décrit dans les expériences.

| | |
|-------------------|------------|
| Sable | 61.1% |
| Limon | 22.0% |
| Argile | 16.9% |
| Matière organique | 3.7% |
| P (soluble) | 121 kg/ha |
| K | 359 kg/ha |
| Ca | 3588 kg/ha |
| Mg | 199 kg/ha |
| PH | 5.7 |