

2m11.2994.1

Université de Montréal

**Caractérisation nutritionnelle de lignées de racines
transformées de tomates, en relation avec la symbiose
endomycorhizienne à arbuscules**

Par

Karine Labour

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)

Juillet 2002

© Karine Labour, 2002



QK
3
U54
2002
V.003

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation nutritionnelle de lignées de racines
transformées de tomates, en relation avec la symbiose
endomycorhizienne à arbuscules**

Présenté par :

Karine Labour

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Denis Barabé, MSc

Directeur de recherche : Marc St-Arnaud, PhD

Co-directeur : Mario Jolicoeur, PhD

Membre du jury : Christiane Charest, PhD

Sommaire

La symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules (EVA) augmente la résistance des plantes face aux microorganismes pathogènes racinaires. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore bien cernés, notamment à cause de la biotrophie obligatoire du champignon EVA. L'amélioration de la nutrition phosphatée des plantes lors de la symbiose EVA serait impliquée dans ces mécanismes. La culture de racines transformées est un outil largement utilisé pour des études fondamentales, incluant la culture *in vitro* de mycorhizes.

Ce projet de Maîtrise porte sur la caractérisation du comportement nutritionnel *in vitro* de lignées de racines transformées d'une plante modèle, la tomate, en symbiose avec le *Glomus intraradices*. Cette étude s'inscrit dans le développement d'un système compartimenté modélisant les interactions de la mycorhizosphère.

Nous avons établi différentes lignées de racines de tomate, transformées par l'insertion de l'ADN-T de l'*Agrobacterium rhizogenes*. La caractérisation des lignées de racines transformées de tomate a montré que l'établissement de la symbiose EVA *in vitro* était relié à la concentration initiale en phosphate inorganique dans le milieu de culture. La réceptivité des lignées au champignon EVA n'était pas associée au type de croissance ni à l'assimilation des nutriments. Par ailleurs, aucun lien direct n'a été trouvé entre le génotype des lignées de racines transformées et la sensibilité à la symbiose EVA.

Des tests préliminaires de compartimentation physique et nutritionnelle des deux partenaires de la symbiose ont été élaborés en boîte de Petri et en bioréacteur de type cuvée, soulignant la difficulté d'application d'un tel concept.

Mots clefs : endomycorhizes à vésicules et arbuscules, *Glomus intraradices*, Ri-T-DNA, *Agrobacterium rhizogenes*, *Lycopersicon esculentum* (tomate), sensibilité mycorhizienne, nutrition, phosphate, compartimentation.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses are known to play a role in increased resistance of plants against soilborne pathogens. Mechanisms involved in this phenomenon are not well understood, partly because AM fungi are obligate biotrophs. The improvement of phosphorus nutrition could be involved in such mechanisms. Hairy roots culture is a pertinent tool for fundamental studies, including *in vitro* culture of mycorrhizas.

This project investigates the *in vitro* characterization of the nutritional behavior of tomato hairy roots, our model plant, in symbiosis with an AM fungus, *Glomus intraradices*. The study is involved in the development of a compartmentalized system to model interactions in the mycorrhizosphere.

Several tomato hairy root lines were transformed with the insertion of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. The establishment of AM symbiosis *in vitro* was related to the initial inorganic phosphate concentration in the culture medium, as revealed during the characterization of tomato hairy root lines. Mycorrhizal receptiveness was not related to growth rates or nutrients uptake. Otherwise, no direct correlation was found between hairy root genotype and mycorrhizal receptiveness.

Preliminary tests, based on physical and nutritional approaches, were performed to compartmentalize partners of the AM symbiosis, in Petri dishes and in a batch bioreactor system, revealing the difficulty of the concept.

Keywords : vesicular and arbuscular mycorrhiza, *Glomus intraradices*, Ri-T-DNA, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots, *Lycopersicon esculentum* (tomato), mycorrhizal responsiveness, nutrition, phosphate, compartmentalized system.

Table des matières

<i>Liste des tableaux</i>	vi
<i>Liste des figures</i>	vii
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	ix
<i>Remerciements</i>	xi
<i>Chapitre 1 : Introduction générale</i>	1-13
1.1 La symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules, ubiquitaire et ancestrale.....	1
1.2 Le champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules, dépendant mais essentiel.....	4
1.3 La communication entre les deux partenaires.....	4
1.4 L' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , vecteur de maladie et outil d'études fondamentales...7	
1.5 Objectifs visés.....	11
<i>Chapitre 2: Arbuscular mycorrhizal responsiveness of in vitro tomato root lines is not related to growth and nutrients uptake rates</i>	14-56
Abstract.....	15
Résumé.....	16
2.1 Introduction.....	17-19
2.2 Materials and methods.....	20-26
2.2.1 Plant material, bacterial strains and transformation conditions.....	20
2.2.2 Preliminary selection of transformed tomato root lines.....	21
2.2.3 Characterization of the six retained root lines.....	22-26
2.2.3.1 Inoculation and incubation of cultures.....	22
2.2.3.2 Root length, fresh and dry weight, mycorrhizal colonization.....	23
2.2.3.3. Extracellular nutrient analysis.....	24

2.2.3.4	Modification of solid M medium.....	25
2.2.3.5	PCR verification of root transformation.....	25
2.2.4	Statistical analysis.....	26
2.3	Results.....	27-38
2.3.1	Plant transformation and hairy root lines selection.....	27
2.3.2	Growth, mycorrhizal receptiveness and nutrients uptake of the six selected lines.....	30
2.3.3	Effect of a reduction of initial Pi concentration of the culture medium on mycorrhizal receptiveness.....	37
2.4	Discussion.....	39-46
2.4.1	Nutritional behavior and mycorrhizal responsiveness.....	39
2.4.2	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> transformation and root line genotype.....	42
2.5	Acknowledgements.....	46
2.6	References.....	47-56
	<i>Chapitre 3 : Conception d'un système multicompartimenté.....</i>	<i>57-74</i>
3.1	Introduction.....	57-58
3.2	Objectifs.....	58-59
3.3	Matériels et méthodes.....	60-69
3.3.1	Matériel végétal et fongique.....	60
3.3.2	Méthodes expérimentales.....	61
3.3.2.1	Compartimentation en boîte de Petri.....	61
3.3.2.2	Compartimentation en système de bioréacteur.....	65
3.4	Résultats et Discussion.....	70-74
3.4.1	Compartimentation en boîtes de Petri.....	70
3.4.2	Compartimentation en bioréacteur de type cuvée.....	71
3.5	Recommandations.....	73-74

<i>Chapitre 4 : Discussion générale</i>	75-83
4.1 Le métabolisme des racines transformées.....	75-79
4.2 Balance hormonale et mycorhization.....	79-82
4.3 Le champignon EVA, un symbiote?.....	82-83
<i>Conclusion générale</i>	84
<i>Bibliographie générale</i>	85-106

Liste des tableaux

Table I.	Preliminary selection of transformed tomato root lines for further characterizations.....	28
Tableau II :	Composition du milieu de culture des racines transformées <i>in vitro</i> , le milieu M.....	63
Tableau III:	Composition des milieux des différents compartiments dans la culture en boîte de Petri à trois compartiments.....	64
Tableau IV:	Composition des milieux de culture dans les six types de bioréacteurs préparés. La concentration indiquée dans chacune des cases correspond à la modification de la concentration de l'élément indiqué à la ligne F (milieu M).....	69

Liste des figures

- Figure 1. PCR amplification of the *rolC* bacterial gene to verify the root lines transformation.....29
- Figure 2. Root biomass (g. dw) of (a) fast growing (FG) lines, (b) slow growing (SG) lines; (c) total root length (cm) of FG, and (d) SG lines, on minimal medium during a 4 months growth period. FG lines: AJ3 line ◁, 4C4 line ■, 4C7 line ★. SG lines: 4C9 line ▼, carrot hairy roots ◆, and cv. Cobra line ○.....31
- Figure 3. Percentage of root colonization by *Glomus intraradices* of the three receptive lines on solid M medium during a four months growth period: 4C4 mycorrhizal line □, 4C9 mycorrhizal line ▽ and carrot mycorrhizal line ◇.....33
- Figure 4. Inorganic phosphate Pi consumptions of FG and SG lines on M medium: 4C4 line (■) 4C9 line (▼), AJ3 line (◁) and carrot hairy root line (◆).....34
- Figure 5. Inorganic nitrate NO₃ consumptions on M medium: 4C4 (a ■), 4C9 (b ▼), AJ3 (c ◁) and carrot hairy root (d ◆).....35
- Figure 6. Carbohydrates consumption of root lines in relation with growth type and mycorrhizal colonization by *Glomus intraradices*. (a-b) Sucrose (□), glucose (○) and fructose (◁) concentration of root lines. Sugars concentration of mycorrhizal (4C4, 4C9) lines are indicated with full symbols.....36

- Figure 7. Percentage of root colonization of the six lines on solid M medium and on solid modified M medium, after 56 days of culture.....38
- Figure 8. Système de compartimentation en boîtes de Petri, dont la composition de chaque compartiment est liée à l'organisme (1 : les deux partenaires de la symbiose ; 2 : le champignon EVA ; 3 : les racines transformées seules).....64
- Figure 9. Vue de dessus du système de bioréacteur mettant en évidence l'aspect de gradient. Les racines mycorhizées étaient inoculées à cheval entre les tubes E et F, au contact des milieux contenus dans ces tubes.....67
- Figure 10. Vue complète du système vide de multi-compartimentation en bioréacteur de type cuvée.....68

Liste des sigles et des abréviations

A.	<i>Agrobacterium</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN-T	ADN transféré par le plasmide bactérien d' <i>A. rhizogenes</i>
Al-P	complexe Al-phosphate
AM	<i>arbuscular mycorrhizal</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adénosine 5'-triphosphate
CHI	chalcone isomerase
CHS	chalcone synthase
cm	centimètre
CO ₂	dioxyde de carbone
cv	cultivar
d	diem
DAOM	<i>Department of Agriculture Ottawa Mycology</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
NTP	nucléotide 5'-triphosphate
dw	<i>dry weight</i>
EMD	<i>extraradical mycelial development</i>
<i>et al.</i>	et alia
EVA	endomycorhizien(ne) à vésicules et arbuscules
Fe-P	complexe fer-phosphate
FG	<i>fast growing</i>
g	gramme
G.	<i>Glomus</i>
Germ.	germination
h	heure
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IFR	isoflavone reductase
kb	kilobase
L	litre
m	mètre
M	minimum (ou minimal)
M3P	Milieu M dont la concentration est triplée en phosphate
mg	milligramme
mL	millilitre
ML	milieu M solide rincé avec du milieu M Liquide
mm	millimètre
mM	millimolaire
MP	milieu M rincé avec du milieu M liquide sans PO ₄

MS	milieu M sans saccharose
NH ₄	ammonium
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NO ₃	nitrate
<i>P</i>	<i>probability level</i>
PAL	phenyl alanine ammonia lyase
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDI	<i>petri dishes invasion</i>
PEP	phosphoénolpyruvate
Pi	phosphate inorganique
PPi	pyrophosphate inorganique
PO ₄	phosphate
$P_{r,s}$	concentration en phosphate inorganique intracellulaire
R^2	<i>determination coefficient</i>
Ri	<i>Root inducing</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SD	<i>standard deviation</i>
SG	<i>slow growing</i>
T _L	<i>transferred left</i>
T _R	<i>transferred right</i>
u	<i>unit</i>
v	volume
w/v	<i>weight/volume</i>
WGG	<i>water Gel Gro rincé</i>
%	pourcentage
°C	degré Celcius
μ	taux de croissance spécifique des racines transformées (d ⁻¹)
μm	micromètre

Remerciements

Cette maîtrise a été ma première vraie expérience dans le monde de la recherche, mais aussi le départ vers un autre pays et une culture différente de la mienne. Cette période, riche en émotions de toutes sortes, ne se serait jamais aussi bien déroulée sans la présence et le soutien d'un certain nombre de personnes.

Mes premiers remerciements sont pour mon directeur de recherche, Marc St-Arnaud (Jardin botanique de Montréal et IRBV) et mon co-directeur, Mario Jolicoeur (Ecole Polytechnique de Montréal) qui ont toujours été très disponibles et patients au cours de cette maîtrise. Marc St-Arnaud est une personne ressource inestimable que j'admire tout autant pour son esprit de synthèse scientifique que pour ses qualités humaines. Mario Jolicoeur m'a apporté une vision très enrichissante et une dimension différente de ce travail.

Je tiens ensuite à remercier Éliane Dumas-Gaudot, grâce à qui je suis entrée en contact avec Marc St-Arnaud, et dont la disponibilité et la gentillesse ne diminuent pas avec le temps.

Je veux remercier Christiane Charest et Denis Barabé pour l'attention qu'ils auront consacrée à la lecture de cette thèse.

Merci aux personnes ressources de l'IRBV et de l'Université de Montréal, qui me facilitent souvent la vie: Stéphane Daigle pour les analyses statistiques, Lorraine Lambert, Diane Denis, Lucie Campeau, Diane Lacasse et Joanne Noiseux, sans oublier Lucie Tittley-Boivert.

Je tiens aussi à remercier les personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer à l'IRBV et à l'Ecole Polytechnique. Jean-Patrick Toussaint est un collègue dont la finesse de

réflexion n'égale que sa joie de vivre et sa gentillesse. Laurence Lamboursain « Lolo » est sans aucun doute la personne qui m'a enseigné le plus de choses durant ces années, tant par son amitié que par son approche unique et ô combien stimulante de la science. Son aide pour les analyses HPLC a de plus été des plus précieuses. Cyril Tikhomiroff est un ami qui m'a aidé à chaque étape de ma progression, depuis la transformation des racines jusqu'à un voyage au bout du monde en fin de parcours. J'adresse mes remerciements les plus sincères aux autres collègues de laboratoire, dont les discussions en tout genre me stimulent toujours: Vladimir Vujanovic, Laetitia Lioussanne, Anne Gigout, Steve Hisiger, Maya Klvana, Dora Gmati, etc.

Comment trouver les mots justes pour dire à mes autres amis combien ils comptent dans ma vie et dans mon cœur ! Ils font tellement partie de ma vie qu'ils représentent ma deuxième famille, celle de Montréal. Leur soutien inconditionnel, surtout dans les moments creux mais aussi dans les périodes fastes, m'apporte une énergie inépuisable. Je pense bien sûr à Cécile Etienne, la meilleure amie qu'on espère trouver un jour et garder pour toujours. Olivier Leloup et Hélène Genty sont deux personnes uniques et tellement riches que je suis honorée de les compter parmi mes proches. Je ne peux pas oublier mes autres amis, Priyum Koonjul, qui m'a aussi aidé pour la PCR, son mari Dave Myburgh, Rose Djiana et sa superbe famille, Sandra Corre, Gaëlle Guais, François Maire et Pierre Béland.

Je vais finir mes remerciements par ceux qui me tiennent le plus à cœur. On dit souvent qu'on choisit ses amis mais pas sa famille. Personnellement, je ne voudrais changer de famille pour rien au monde. Ma mère, Annick, est la mère que tous les enfants du monde mériteraient d'avoir, tant son amour est grand. Mon père, Jean, et mes deux extraordinaires frères, Stéphane et Maxime, sont indissociables de ma réussite. Ils m'ont infailliblement soutenu dans mes choix, mes doutes, mes erreurs, mes réussites. La force de cohésion de ma famille et l'amour toujours grandissant qui nous unis sont les clefs de ma stabilité. C'est grâce à eux et pour eux que je suis rendue là où je suis aujourd'hui.

Chapitre 1

Introduction générale

Les plantes interagissent depuis des millions d'années avec leur environnement immédiat. La survie et l'évolution des espèces semblent intimement reliées à la dynamique écologique de cet environnement. L'étude de la partie souterraine des plantes a longtemps été éludée, particulièrement à cause de son manque de visibilité immédiat. La zone où les racines des plantes interagissent avec la microflore environnante et les constituants du sol porte le nom de rhizosphère (Uren, 2001). L'équilibre dynamique de la rhizosphère est strictement associé aux interactions entre les différentes composantes. Certains microorganismes de la rhizosphère, incluant saprophytes et symbiotes, ont un impact substantiel et bénéfique sur la croissance et la santé des plantes ainsi que sur les propriétés physico-chimiques du sol. C'est le cas des champignons mycorrhiziens (Barea, 2000).

1.1 La symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules, ubiquiste et ancestrale

Le terme *mykorrhizen* fut employé pour la première fois en 1885 par le botaniste allemand Franck pour décrire une association non-pathologique entre des champignons et les racines de plantes supérieures. Il a décrit différents types de cette association, comme la forme ectotrophique chez certains arbres, et la forme endotrophique chez les orchidées et les bruyères (Rayner, 1927). L'idée que des champignons puissent

contribuer positivement à la santé des plantes était audacieuse à une époque où les scientifiques considéraient systématiquement les interactions plantes-champignons comme pathologiques.

Les associations mycorhiziennes sont presque ubiquistes, trouvées dans des habitats allant des déserts aux forêts tropicales, depuis l'arctique jusqu'aux sommets des montagnes. La symbiose endomycorhizienne à vésicules et arbuscules (EVA) est la plus commune et plus de 80% des plantes vasculaires sont considérées comme endomycorhiziennes (Smith and Read, 1997). Il existe cependant d'autres associations mycorhiziennes qui varient dans la forme et la fonction : les ectomycorhizes sont des associations symbiotiques entre les racines d'espèces ligneuses et de champignons appartenant principalement aux Basidiomycètes et à quelques Ascomycètes. Les ectomycorhizes possèdent trois structures caractéristiques : un manteau de tissu fongique entourant la racine, un réseau interne d'hyphes entre les cellules corticales (le réseau de Hartig) et un mycelium externe formé par des agrégats d'hyphes. Les plantes de l'ordre des Ericales forment des endosymbioses mycorhiziennes dont trois formes ont été décrites : la forme éricoïde est trouvée par exemple chez des bruyères poussant en sols acides ou tourbeux ; la forme arbutoïde qui possède des caractéristiques à la fois des endo- et des ectomycorhizes est présente chez de nombreuses espèces de Pyrolacées; la forme monotropoïde où le champignon colonise des plantes achlorophylliennes de la famille des Monotropacées. Toutes les espèces de la famille des Orchidées, sauf quelques rares exceptions, dépendent pour leurs premiers stades de développement d'une association endomycorhizienne avec certains Basidiomycètes. Ces champignons

s'associent à la plante dès les stades précoces de germination des graines qui possèdent peu de réserves nutritives. Cette dépendance diminue ou disparaît lorsque la plante se développe chez certaines espèces, alors qu'elle persiste pour toute la vie de la plante pour d'autres espèces. Il existe enfin une dernière forme intermédiaire, les ectendomycorhizes, principalement trouvée sur des conifères et des arbres à feuilles caduques en pépinières (Smith and Read, 1997).

Les plantes sont considérées comme non-mycotrophes lorsqu'elles ne possèdent aucune structure typique d'une symbiose mycorhizienne, à savoir des vésicules et des arbuscules pour la symbiose EVA ou les structures typiques des autres types de symbioses mycorhiziennes. Ces plantes appartiennent essentiellement aux familles des Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Juncaceae et des Proteaceae. Toutes les espèces de ces familles ne sont cependant pas non-mycotrophes (Tester *et al.*, 1987).

L'impact bénéfique de la mycorhization sur la santé et la survie des plantes est vaste (Zak, 1964; Nicholson, 1967; Mosse, 1973; Gerdemann, 1975; Schenck and Kellam, 1978; Douds and Millner, 1999; Harrison, 1999) et existe depuis longtemps (Remy *et al.*, 1994). L'analyse de plantes fossilisées datant du début du Dévonien a révélé la présence de structures rappelant celles des arbuscules (Simon *et al.*, 1993). De plus, une étude phylogénétique comparant des séquences d'ADN ribosomiaux de plusieurs espèces de Glomales, a permis d'évaluer l'apparition de ces champignons mycorhiziens à environ 353-462 millions d'années avant notre époque, ce qui coïncide avec l'ère de colonisation de l'espace terrestre par les plantes (Redecker *et al.*, 2000).

1.2 Le champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules, dépendant mais essentiel

Les champignons endomycorhiziens à vésicules et arbuscules (EVA) sont des Zygomycètes de l'ordre des Glomales et ils sont biotrophes obligatoires (Morton and Benny, 1990). L'association des champignons EVA est relativement peu spécifique, hautement compatible et ce mutualisme ancestral profite aux deux partenaires. La plante fournit le carbone au champignon dont il est entièrement dépendant. La contribution du champignon EVA semble plus complexe : il acquiert les éléments minéraux du sol dont le phosphate (Clark and Zeto, 2000), améliore la résistance des plantes aux organismes pathogènes invasifs (St-Arnaud *et al.*, 1995a; Harrison, 1998), favorise la biodiversité des espèces végétales dans les écosystèmes restaurés (Van Der Heijden *et al.*, 1998) et intervient dans la stabilisation de la structure des sols (Schreiner and Bethlenfalvay, 1995). La compréhension des conséquences des pratiques agricoles sur la biodiversité et le fonctionnement de ces champignons EVA est un sujet d'actualité. Des résultats provenant de ce genre d'étude pourraient argumenter en faveur d'une utilisation plus efficace et importante de cette symbiose pour participer au succès de l'agriculture durable.

1.3 La communication entre les deux partenaires

La symbiose EVA est composée de trois éléments essentiels: la racine elle-même, les structures fongiques spécialisées dans le cortex racinaire (les vésicules et les arbuscules) et un mycélium extraradicalaire. Les vésicules sont des structures fongiques

de stockage contenant beaucoup de lipides et de nombreux noyaux, dont la forme dépend principalement de l'espèce de champignon. Tous les champignons EVA ne développent pas cet organe de stockage dans les racines: les *Scutellospora* et les *Gigaspora* ne forment pas de vésicules mais produisent des cellules auxiliaires sur le mycélium extraradicalaire (Smith and Read, 1997). Les arbuscules sont des structures transitoires et hautement ramifiées, qui se développent dans les cellules du cortex racinaire. Le développement d'un arbuscule dans une interaction endomycorhizienne de type *Arum* commence par la pénétration d'un hyphes dans l'espace intercellulaire du cortex racinaire. L'hyphes pénètre à travers la paroi d'une cellule corticale pour former le tronc principal de l'arbuscule. La membrane plasmique n'est pas transpercée mais au contraire croît autour de l'hyphes et épouse parfaitement toutes ses ramifications dichotomiques subséquentes (Burleigh, 2000). La membrane périarbusculaire augmente la surface de contact entre le champignon et la cellule, tout en conservant le champignon hors du cytoplasme, caractéristique fondamentale de cette symbiose apoplastique (Ayling *et al.*, 1997; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000) et site d'échanges actifs (Guttenberger, 2000). Une fois la première colonisation intraracinaire réussie, le champignon développe un mycélium extraradicalaire. Le mycélium est composé d'un réseau d'hyphes et de spores qui se déploie profusément dans le sol environnant. C'est une source de nouvelles infections du même système racinaire et possiblement d'autres plantes environnantes.

L'établissement de la symbiose nécessite la coordination du développement des deux partenaires ainsi qu'un échange de signaux. Les spores quiescentes des

champignons EVA sont capables de germer en absence de racines et le tube germinatif peut croître indépendamment sur plusieurs cm pendant quelques semaines (Bago *et al.*, 2000). Durant cette période de croissance autonome, le champignon convertit ses réserves lipidiques en hexoses et tréhalose, via l'acétyl CoA, précurseur métabolique du cycle de Krebs, pour la synthèse d'ADN et des parois cellulaires (Bago *et al.*, 1999). Les intermédiaires du cycle de Krebs sont les seuls liens entre le catabolisme des lipides et l'anabolisme d'autres composés organiques. Cependant il manque un carbone pour compléter ce cycle. Les organismes vivants ont recours à des voies anaplérotiques pour palier ce genre de problème : si la plante produit du malate et de l'oxaloacétate à partir du pyruvate (Taiz and Zeiger, 1998), il est proposé que le champignon fixe et utilise le CO₂ pour compléter son métabolisme (Bécard and Piché, 1989; Bécard *et al.*, 1992; Bago *et al.*, 1999). Les spores germinatives semblent aussi capables de prélever des hexoses, mais relativement peu en comparaison avec les hyphes intraracinaires (Bago *et al.*, 2000).

La participation active de la plante reste cependant primordiale pour la formation effective de la symbiose. Les exsudats racinaires stimulent la croissance et la ramification des hyphes fongiques. La nature des exsudats est vaste, complexe et dépend strictement de l'espèce végétale (Rovira, 1959) ainsi que de son statut nutritionnel (Grayston *et al.*, 1997). Les exsudats des plantes mycotrophes diffèrent de ceux des espèces non-mycotrophes (Schwab *et al.*, 1983; Pinior *et al.*, 1999). Les exsudats des espèces non-mycotrophes ne stimulent pas le développement des champignons EVA, et parfois même l'inhibent (Schreiner and Koide, 1993; Vierheilig *et al.*, 1998; Buée *et al.*,

2000). La caractérisation des exsudats intervenant dans le dialogue entre la plante hôte et le champignon EVA, n'est pas établie clairement. Il a été récemment proposé que les mêmes molécules pourraient aussi avoir un impact sur les autres microorganismes de la mycorrhizosphère (Vierheilig and Piché, 2002). La recherche du « facteur de mycorrhization » est toujours d'actualité.

La complexité de ces mécanismes nécessite le développement d'outils et de méthodes pour analyser ces phénomènes afin de mieux les comprendre. Les racines transformées par l'*Agrobacterium rhizogenes* en culture *in vitro* représentent l'un de ces outils.

1.4 L'*Agrobacterium rhizogenes*, vecteur de maladie et outil d'études fondamentales

L'*A. rhizogenes*, une bactérie gram-négative du sol, est l'agent aetiological de la maladie des racines chevelue ou *hairy roots*, découverte au début du siècle dernier sur des pommiers (Riker *et al.*, 1930; Hildebrand, 1934). Cette bactérie provoque la formation néoplasique de fines racines adventives sur une zone blessée des plantes qu'elle infecte. Les conséquences économiques et agricoles de cette maladie sont relativement limitées en comparaison avec la maladie du *crown gall*, causée par une autre bactérie de la même famille, l'*Agrobacterium tumefaciens*. Plus de 450 espèces de plantes dicotylédones sont sensibles à l'*A. rhizogenes* (Porter, 1991). Les plantes infectées produisent temporairement des opines, source de carbone et d'azote pour les agrobactéries dans la rhizosphère (Tepfer and Tempé, 1981). Les isolats d'*A. rhizogenes*

ont été classés selon le type d'opine produit par la plante parasitée, soit l'agropine, la cucumopine, la mannopine ou la mikimopine (Meyer *et al.*, 2000). Les souches de type agropine contiennent les régions d'ADN-T_R (Transferred right) et T_L (Transferred left) dans leur plasmide Ri (Root inducing), alors que les autres souches ne contiennent que la région T_L (White *et al.*, 1982; Slightom *et al.*, 1986).

L'infection comprend une série complexe d'évènements dont l'enchaînement est défini par les activités cellulaires des deux partenaires. Les processus cellulaires d'infection semblent similaires pour l'*A. rhizogenes* et l'*A. tumefaciens*, même si la majorité des études a été réalisée sur l'*A. tumefaciens* (Gelvin, 2000). Le processus est enclenché lorsqu'une plante blessée produit des sucres et des composés phénoliques impliqués dans la biosynthèse des phytoalexines et des lignines, comme l'acétosyringone (Stachel *et al.*, 1985). Ces molécules sont perçues par la protéine bactérienne VirA (Lee *et al.*, 1995), qui s'autophosphoryle et transphosphoryle la protéine VirG, activant la transcription des gènes bactériens *vir*. Les protéines Vir synthétisées *de novo* interviennent dans le transfert des régions d'ADN-T (Gelvin, 2000). Les protéines VirD2 et VirE2 s'associent à l'ADN-T simple brin pour former le complexe T et le diriger dans la cellule hôte. VirD2 est une endonucléase qui reconnaît et coupe les bordures de l'ADN-T, puis se lie par covalence à une phosphotyrosine à l'extrémité 5' de l'ADN-T pour son transfert via le *pilus* composé de protéines VirB. Les protéines VirE forment un manteau autour de l'ADN simple brin pour le protéger des nucléases de la plante. La formation du *pilus* se réalise en deux étapes et nécessite l'expression de nombreux gènes dont les plus importants sont les gènes *attR*, *chvA*, *chvB*

et *pscA* : la bactérie s'ancre sur la paroi cellulaire à l'aide d'un polysaccharide acétylé puis élabore des fibrilles de cellulose pour renforcer l'attachement (Escudero *et al.*, 1995; Gelvin, 2000). L'ADN-T est intégré comme la majorité des ADN exogènes, c'est à dire par recombinaison illégitime (Paszkowski *et al.*, 1998). Les mécanismes exacts d'intégration dans le génome de la plante restent cependant peu connus. L'intégration est relativement instable et semble être aléatoire parmi les chromosomes, avec une préférence pour les régions transcrites. Plusieurs régions d'ADN-T peuvent être co-transférées sous forme de concatamères (deux ou plusieurs unités moléculaires identiques liées par covalence les unes à côté des autres) sur un même site dans une cellule, indiquant que les mécanismes ne sont pas liés au hasard uniquement (Tinland, 1996). Les souches bactériennes utilisées dans notre expérience sont de type agropine contenant les régions d'ADN-T_R et T_L, dont chacune peut induire indépendamment la transformation (Vilaine and Casse-Delbart, 1987). Des délétions dans la région T_L ont moins de conséquences sur l'ontogenèse que dans la région T_R (White *et al.*, 1985). La séquence de la région T_R, responsable de la synthèse d'auxines, est proche de celle de l'ADN-T de l'*A. tumefaciens*, alors que la séquence de la région T_L montre des homologies avec des séquences du génome d'une plante non transformée, la *Nicotiana glauca* (White *et al.*, 1983).

Le potentiel d'utilisation de l'agent de cette maladie comme vecteur de la transformation des plantes a commencé à être exploité dans le milieu des années 1980, principalement pour la production de métabolites secondaires (Hamill and Lidgett, 1997). Avant cette période, de nombreux travaux ont été réalisés sur la biologie de

racines excisées mais non-transformées (Butcher and Street, 1964). La première étude fut celle de Robbins (1922) qui testa différentes variantes de la solution nutritive de Pfeffer sur la croissance en milieu liquide stérile d'apex racinaires de pois, coton et de maïs. White démontra par la suite que des racines non-transformées de blé et de tomates pouvaient être cultivées indéfiniment sur un milieu relativement simple contenant des sels et un extrait de levure (White, 1932; 1934).

Les premiers protocoles d'établissement des cultures de racines transformées ont été décrits au milieu des années 1980 (Hamill *et al.*, 1987; Rhodes *et al.*, 1987). Les racines transformées présentent de multiples avantages par rapport à la culture de plantes entières ou de racines excisées. La transformation est simple à réaliser : l'inoculation de bactéries activées (Sunilkumar *et al.*, 1999) sur une partie de plante blessée induit la formation de racines en quelques semaines (1 à 4 semaines environ). Chaque nouvelle racine est considérée comme lignée unique (Chilton *et al.*, 1982). La confirmation de la transformation est réalisable en détectant les opines juste après la transformation car leur expression est instable dans le temps (Tepfer and Tempé, 1981; Guivarc'h *et al.*, 1999), par *Southern blot* (Rhodes *et al.*, 1987), ou par PCR (Piñol *et al.*, 1999). Les racines transformées sont caractérisées par un haut degré de ramification latérale, une profusion de poils absorbants et souvent une perte de géotropisme (Meyer *et al.*, 2000). Elles se cultivent indéfiniment sur un milieu simple sans addition d'hormones. Les racines transformées peuvent donner de très importantes biomasses à partir d'un inoculum faible, sans montrer une phase de latence trop importante, même si

le taux de croissance et le phénotype varient significativement selon les espèces de plantes transformées (Toivonen, 1993).

Les premiers travaux sur la symbiose mycorhizienne en culture *in vitro* avec des racines excisées remontent à 1975 (Mosse and Hepper, 1975), alors que la première utilisation des racines transformées fut quelque peu ultérieure (Mugnier and Mosse, 1987; Bécard and Fortin, 1988; Mugnier, 1997). Un système expérimental *in vitro* permettant la croissance active du champignon EVA axénique, dans un espace géographiquement distinct de la racine hôte, a été conçu et validé au laboratoire (St-Arnaud *et al.*, 1995b; 1996). L'utilisation de ce dispositif a révélé des observations intéressantes sur la biologie du champignon. La culture *in vitro* de racines transformées est utilisée par plusieurs équipes pour l'étude de différents aspects de la symbiose EVA, dont la nutrition du champignon EVA (Bago *et al.*, 1998; 1999; 2000), la dynamique nutritionnelle de la symbiose (Jolicoeur *et al.*, 1999) et l'interaction directe du champignon EVA avec d'autres micro-organismes (St-Arnaud *et al.*, 1995b; Filion *et al.*, 1999).

1.5 Objectifs visés

Ce projet de Maîtrise s'inscrit dans le développement d'un système modèle compartimenté *in vitro* simulant la mycorhizosphère. Ce système servira d'outil d'analyse et de modélisation des interactions entre la symbiose EVA et les constituantes physico-chimiques et biologiques de l'environnement racinaire. Le but du projet est

d'analyser l'importance relative du comportement nutritionnel des deux partenaires de la symbiose EVA en culture *in vitro*. La variabilité du comportement des symbiotes sera un facteur essentiel pour la détermination des lignées racinaires les mieux adaptées au système d'étude en développement.

La culture *in vitro* des endomycorhizes est un outil utile et abondamment utilisé depuis les premiers travaux publiés sur le sujet. La grande majorité des études a été accomplie sur une seule lignée de racines, la lignée de racines transformées de carotte, établie par Bécard et Fortin (1988). A ce jour, peu de travaux ont été réalisés sur le comportement nutritionnel des racines transformées de carotte en relation avec la symbiose endomycorhizienne (Jolicoeur *et al.*, 1999; 2002). Mais à notre connaissance, le comportement nutritionnel de la plante hôte lors des phases de précolonisation par un champignon EVA en culture *in vitro*, n'a jamais été caractérisé.

Le deuxième chapitre de ce mémoire traite de la transformation et de la caractérisation nutritionnelle de lignées de racines transformées de tomates, en relation avec l'établissement de la symbiose EVA avec le *Glomus intraradices*. La tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) est la plante modèle qui a été retenue parmi une vingtaine de plantes d'intérêt agronomique. Cette plante a été choisie sur des caractéristiques répondant aux critères qui seront mis en relief dans cette étude. Ce chapitre est présenté sous forme de manuscrit et est rédigé en anglais. Ce manuscrit sera soumis à la revue *Canadian Journal of Botany*. Le troisième chapitre relate les principales approches utilisées afin de compartimenter physiquement les différentes

parties de la symbiose, à savoir (a) la racine mycorhizée, (b) une partie connectée de ce même système racinaire mais sans la présence physique du champignon EVA et (c) la phase extramatricielle du champignon EVA. Cette section n'a pas permis le développement et la validation du système de compartimentation souhaité, mais elle est tout de même présentée dans ce mémoire afin de documenter le travail effectué dans cette direction.

Accord des coauteurs en vue de publication d'un article dans une revue
scientifique

Étudiante : Karine Labour

Programme : M. Sc. Sciences Biologiques

Description de l'article :

L'article sera soumis pour publication à la revue scientifique *Canadian Journal of Botany* sous le titre suivant:

Labour, K., Jolicoeur, M., and St-Arnaud, M. Arbuscular mycorrhizal responsiveness of *in vitro* tomato root lines is not related to growth and nutrient uptake rates

Déclaration des coauteurs autres que l'étudiant:

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Karine Labour inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Caractérisation nutritionnelle de lignées de racines transformées de tomates, en relation avec la symbiose endomycorhizienne à arbuscules ».

Mario Jolicoeur

Coauteur

27/8/02
Date

Marc St-Arnaud

Coauteur

27/8/02
Date

Chapitre 2

Arbuscular mycorrhizal responsiveness of in vitro tomato root lines is not related to growth and nutrient uptake rates

Ce chapitre sera soumis pour publication à la revue scientifique *Canadian Journal of Botany* sous le titre suivant:

Labour, K., Jolicoeur, M., and St-Arnaud, M. Arbuscular mycorrhizal responsiveness of *in vitro* tomato root lines is not related to growth and nutrient uptake rates.

Abstract

Variability in the growth and nutritional dynamics of *in vitro* tomato hairy root lines and relationship with responsiveness to mycorrhizal colonization were studied. Four tomato cultivars were transformed with three *Agrobacterium rhizogenes* strains to obtain several hairy root lines. Four transformed hairy root lines were characterized and compared to excised roots of the non-transformed cv. Cobra and to Ri-T-DNA carrot hairy roots during four months on minimal medium, in term of growth, nutrients uptake and mycorrhizal receptiveness to the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. In a sub-experiment, the cultures were performed on a modified medium to assess the contribution of initial inorganic phosphate concentration in mycorrhizal susceptibility of the three initially non-receptive lines. On minimal medium, growth and nutrient uptake rates were highly correlated, but both unrelated to mycorrhizal receptiveness. All the lines successfully established the symbiosis when the initial phosphate concentration was significantly reduced. No direct correlation was found between lines genotypes issue from different tomato cultivar-bacterial strain combinations and the absence of symbiosis on minimal medium. Decrease of inorganic phosphate concentration at the beginning of the culture was a key factor involved in precolonization steps of mycorrhizal symbiosis.

Key words: arbuscular mycorrhiza, *Glomus intraradices*, hairy roots, *Lycopersicon esculentum*, tomato, mycorrhizal responsiveness, root nutrition, inorganic phosphate.

Résumé:

La variabilité de la croissance et de la dynamique nutritionnelle de racines transformées de tomate *in vitro*, a été étudiée en relation avec la réceptivité des racines à la symbiose endomycorhizienne. Quatre cultivars de tomate ont été transformés à l'aide de trois souches d'*Agrobacterium rhizogenes*, afin d'obtenir plusieurs lignées de racines transformées. La croissance, l'assimilation des nutriments et la réceptivité au champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules, le *Glomus intraradices*, ont été caractérisées sur milieu minimum pendant quatre mois pour quatre lignées de racines transformées. Elles ont été comparées avec des racines excisées du cultivar non-transformé Cobra et avec la lignée de racines transformées de carotte. Dans une seconde expérience, les cultures ont été réalisées sur un milieu minimum modifié afin d'évaluer l'effet de la concentration en phosphate inorganique sur la réceptivité des trois lignées initialement non-réceptives au champignon endomycorhizien. Sur milieu minimum, les taux de croissance et d'assimilation des nutriments étaient hautement corrélés entre eux, mais pas avec la susceptibilité à la symbiose. Toutes les lignées ont établi la symbiose lorsque la concentration initiale en phosphate a été significativement réduite. Aucun lien direct n'a été établi entre l'absence de symbiose sur milieu minimum et le génotype des lignées, issu des différentes combinaisons entre des cultivars de tomate et des souches bactériennes. La diminution de la concentration en phosphate inorganique au début de la culture a été un facteur déterminant dans les étapes de pré-colonisation de la symbiose endomycorhizienne.

Mots clés: endomycorhizes à vésicules et arbuscules, *Glomus intraradices*, racines transformées, *Lycopersicon esculentum*, tomate, sensibilité mycorhizienne, nutrition racinaire, phosphate inorganique.

2.1 Introduction

Studies of mycorrhizas in natural ecosystems and low-tillage agriculture clearly illustrate the multiple benefits of this ancestral symbiosis in any climate and geographical location. Tomorrow's advances in agricultural practices should consider the inoculation and the subsequent management of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, which require more knowledge concerning the functioning of the two partners of the symbiosis. It is well known that AM fungi enhance the plant nutrition (Smith and Read, 1997), increase protection against biotic (St-Arnaud *et al.*, 1995a) and abiotic stresses (Dodd, 2000), favor the biodiversity of plants ecosystems (Van Der Heijden *et al.*, 1998), and stabilize the soil structure (Schreiner and Bethlenfalvay, 1995). Host range of AM fungi are wide but plant species and even plant cultivars responsiveness to mycorrhizal colonization differs considerably. The signaling events that regulate host roots and AM fungi interactions are modulated by several factors. Those factors include the composition of root exudates (Grayston *et al.*, 1997), as well as plant genotype (Bryla and Koide, 1998) and abiotic factors like nutrient availability in the rhizosphere (Marschener, 1998). The intrinsic complexity of natural ecosystems reflects the reality of interactions between plants and associated microorganisms like AM fungi. However, the mechanisms involved are not well understood, partly because AM fungi are obligate biotrophs, a feature that seriously complicates the study of their metabolism and physiology. Moreover, the presence of other microbial communities renders the supply of the AM fungi unclear. Axenic root-organ culture, including *in vitro* hairy roots

culture, is a pertinent tool to simplify and study the steps involved in mycorrhizal symbiosis, as recently reviewed by Fortin et al. (2002).

Hairy roots have been used to study arbuscular mycorrhizas *in vitro* since the middle of the 1980's (Mugnier and Mosse, 1987; Bécard and Fortin, 1988), with recent breakthroughs towards direct interactions between AM fungi and soil microorganisms (St-Arnaud *et al.*, 1995b; Filion *et al.*, 1999), nutrient uptake by mycorrhizas (Jolicoeur *et al.*, 1999; 2002; Bago *et al.*, 2000; Toussaint, 2002) as well as enhanced production of AM fungi propagules (Declerck *et al.*, 1996; Fortin *et al.*, 1996; St-Arnaud *et al.*, 1996; Jolicoeur *et al.*, 1999). Pre-symbiotic signalization from carrot hairy roots was considered (Bécard and Piché, 1989; 1990) and root exudates of mycotrophic hairy roots were shown to greatly stimulate the hyphal growth of AM fungi germinated spores (Nagahashi *et al.*, 1996; Jolicoeur *et al.*, 1998; Buée *et al.*, 2000; Douds and Nagahashi, 2000). The majority of *in vitro* experiments characterizing mycorrhizas were done with the carrot hairy root line established by Bécard & Fortin (1988). Hairy roots of strawberry (Nuutila *et al.*, 1995) and tomato (Simoneau *et al.*, 1994; Khaliq and Bagyaraj, 2000) were also developed with fewer studies published. Those researches were performed with only one transformed line. Recently Boisson-Dernier et al. (2001) established hairy roots of *Medicago truncatula*, which allow not only the study of the arbuscular mycorrhizas but also the *Rhizobium* association.

Within the context of developing an *in vitro* model system suitable to scrutinize the mechanisms involved in the interaction between the AM symbiosis and the environment, the characterization of the growth and nutritional kinetics of the model organisms was required. To date, the nutrition of hairy roots remains under-explored in

mycorrhizas *in vitro* experiments, even if studies with entire plants demonstrated the key role of nutrient availability in the soil. Nutritional researches were performed *in vitro* with strawberry and carrot hairy roots in symbiosis with AM fungi (Nuutila *et al.*, 1995; Jolicoeur *et al.*, 1999) and with the previous carrot hairy roots line (Bouchard-Marchand, 2000). The ease of use of hairy roots indicated that transformation of agronomic plants with *Agrobacterium rhizogenes* would favor the analysis of fundamental aspects of nutritional requirements of plants in relation with the AM symbiosis. Among many agronomic plants, we chose the tomato as a model plant for *in vitro* studies on several factors. Tomato is already a model plant for studies on bioprotection of entire plants (Dassi *et al.*, 1998; Pozo *et al.*, 1999, Steinberg *et al.*, 1999). *In vitro* studies of mycorrhizas often included excised roots of tomato as a control (Chabot *et al.*, 1992; Diop *et al.*, 1994; Bago *et al.*, 1998). Moreover, tomatoes are easily transformed with *A. rhizogenes* (Joao and Brown, 1994) and the Solanaceae did not established symbiosis with rhizobacteria. Another interest was the possibility to compare tomato hairy roots with the well-known carrot hairy root line. In fact, particular attention has to be devoted to the physiological responses of hairy roots, to estimate their inherent variability, before understanding interactions with soil organisms. The specific aim of this work was therefore to characterize the growth, nutrient kinetics and mycorrhizal receptiveness to *Glomus intraradices* of transformed root lines obtained from different tomato cultivars and *A. rhizogenes* strains, as compared with a non-transformed tomato root line and a carrot hairy root line.

2.2 Materials and methods

2.2.1 Plant material, bacterial strains and transformation conditions

Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Cobra, Joker, Springfield and Vendor) (Société Coopérative Agricole du Sud de Montréal, Sherrington, Qc, Canada) seeds were surface sterilized for 15 min in 70% (v/v) ethanol, 20 min in a solution of 1.2% (v/v) sodium hypochlorite plus 1% (v/v) Triton X100, and rinsed 3 times with sterile distilled water. Seeds were germinated in Magenta boxes on minimal (M) medium solidified with 0.4% (w/v) gellan gum (Gel Gro: ICN Biochemical, Cleveland, OH, USA) (St-Arnaud *et al.*, 1996) maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ in continuous light.

Agrobacterium rhizogenes strains A4, R1000 and ATCC 15834 were routinely grown on solid nutrient agar and stored at 4°C . *A. rhizogenes* strains freshly grown (72h) on 8g.L^{-1} nutrient broth liquid medium were recovered by centrifugation (7700 g for 20 min) and co-cultivated for 48h with tomato leaf and stem pieces on liquid M medium to improve *A. rhizogenes* transformation efficiency as previously described for *A. tumefaciens* (Sunilkumar *et al.*, 1999), before filtration to remove plant parts.

Leaf and stem pieces of the four tomato cultivars were submerged for 2h into the bacterial filtrate of each of the three bacterial strains, then thoroughly rinsed with liquid M medium and transferred on solid M medium, complemented with 0.5 g.L^{-1} of carbenicillin (Nauerby *et al.*, 1997). Each emerging root apex was excised at 10-15 mm and placed in Petri dish (100 x 15 mm) filled with 25 ml of fresh solid M medium, to

initiate a unique root line. At least three successive subcultures were necessary to remove the bacteria from the transformed root lines.

2.2.2 Preliminary selection of transformed tomato root lines

Among the initial lines obtained after *A. rhizogenes* transformation, fifteen lines were able to grow on solid M medium, without exogenous bacterial development. Lines were compared during four weeks. Root growth was qualitatively followed on solid and in liquid M medium. Half of the Petri dishes (100 x 15 mm) filled with 25 mL of solid M medium were placed upside down in order to determine the geotropism of the lines. Premature ageing and lack of adaptation to culture conditions of the lines were estimated with regards to yellowing of the roots and development of unexpected calluses.

Spores of the AM fungus *Glomus intraradices* Schenk & Smith (DAOM 181602) were extracted from three-month-old *in vitro* dual cultures with Ri T-DNA-transformed carrot roots, as described by St-Arnaud *et al.* (1996). Prior to inoculation, spores were stored two weeks in sterile distilled water at 4°C to enhance germination (Juge *et al.*, 2002). Among the fifteen transformed lines, the eight lines that have shown the best development during the previous four-weeks evaluation period were inoculated with *G. intraradices*. Gel pieces (2 x 1 x 0.5 cm) containing 15-20 cm of vigorously growing roots were transferred on fresh solid M medium, inoculated with a spores suspension (75-100 spores) and incubated at 26°C in the dark during four weeks. Evaluation of mycorrhizal potential of the lines was based on the germination of AM

fungus spores and development of an extraradical mycelium network connected with the roots.

2.2.3 Characterization of six retained root lines

Based on the preliminary selection, four transformed lines (AJ3, 4C4, 4C7 and 4C9) were chosen for further characterization and compared with the non-transformed cv. Cobra root line and a carrot hairy root line. This carrot hairy root line is routinely used in our laboratories as a standard (Jolicoeur *et al.*, 1999; St-Arnaud *et al.*, 1996; Toussaint, 2002). The behavior of the six root lines was monitored during sixteen weeks on solid M medium, as described further. The experimental design was a Split-split-plot in five blocks, with the six plant root lines randomized among the main plots, *G. intraradices* inoculation or non-inoculated control treatments randomized among the first level subplots, and 23 sampling dates randomized among the second level subplots. There was one Petri dish within each second level subplot, giving five replicates of each treatment per sampling date. Samplings were done every four days during the first eight weeks then every eight days for the following eight weeks.

2.2.3.1 Inoculation and incubation of cultures

To increase the root biomass and to ensure a homogeneous physiological state within the inoculum, roots lines were cultivated on liquid M medium in Petri dishes, in the dark at 26°C, for four weeks. Five roots sections (3 apex and 2 subsequent segments

of the apex), 2 cm in length, were therefore cut and placed in parallel at 1cm to each other in Petri dishes (100 x 15 mm) filled with 25 ml of solid M medium. Approximately 150 spores of *G. intraradices* (prepared as described above) contained in 0.5 ml of sterile distilled water, were inoculated per Petri dish, close to the root explants. Mycorrhizal controls received the same volume of sterile distilled water without spores. The Petri dishes were incubated in the dark at 26°C. According to their geotropism, the Petri dishes containing the AJ3 and the carrot hairy root lines were incubated upside down.

2.2.3.2 Root length, fresh and dry weight, mycorrhizal colonization

On each sampling date, the Petri dishes were frozen overnight at -20°C, and then thawed at ambient temperature to liquefy the gel (Filion *et al.*, 1999). The roots were easily extracted from the medium, gently pressed between absorbent towels to remove excess of water. Fresh weight, dry weight (48h at 70°C) and root length were measured; total root length was estimated by scanning the roots and images were analyzed with the WinRhizo® software (Regent Instruments, Québec, Canada), based on fractal analysis (Tatsumi *et al.*, 1989). Root mycorrhizal colonization was measured every two sampling dates after staining with fuschin acid (Kormanik and McGraw, 1982) using the gridline intersection method (Giovannetti and Mosse, 1980).

2.2.3.3 Extracellular nutrient analysis

After root harvesting, the remaining medium was centrifuged for 30 min at 39200 g to remove residual gelling agent (Filion *et al.*, 1999). The supernatant was filtered (0.45 μm) and stored at -20°C until further analysis. HPLC analyses were done according to Jolicoeur *et al.* (1999) with the following modifications: major anions (NO_3^- , PO_4^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-}) and cations (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) were analyzed using a Dionex (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) HPLC system equipped with a gradient pump IP20, an automated sampler AS3500, and a pulse electrochemical detector CD20 in conductivity mode, all controlled with Dionex Peaknet 5.1 software. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS-14 column and an ASRS-ultra Dionex anion suppressor. The mobile phase consisted of a bicarbonate buffer solution (2 mM Na_2CO_3 and 1 mM NaHCO_3) flowing at a rate of $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Cations were separated using a 4 x 250 mm IONPAC CS-12A column and a CSRS-ultra Dionex cation suppressor. The mobile phase consisted of a methanesulfonic solution (20 mM) flowing at a rate of $0.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Glucose, fructose and sucrose concentrations of the media were analyzed by HPLC using a Beckman Coulter pump model 126, a Beckman Coulter automatic injector model 508, a Beckman refractive index detector. The chromatograms were acquired with the 32 Karat Software (Beckman Coulter Canada Inc, Mississauga, ON, Canada). Carbohydrates were separated using an Alltech 700CH column (Alltech Canada, Guelph ON, Canada) maintained at 85°C . The mobile phase consisted of deionized water flowing at a rate of $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

2.2.3.4 Modification of solid M medium

In order to test the mycorrhizal affinity of the initially non-receptive lines, a sub experiment was performed after modification of the solid M medium. The gellan gum contains inorganic phosphate (Pi) increasing the phosphate concentration of the M medium up to 0.118 mM, which should contain 0.035 mM of Pi (Doner and Douds, 1995; Jolicoeur *et al.*, 2002). The solid M medium was therefore rinsed four times with liquid M medium to equilibrate initial pH and ion concentrations: 25 ml of solid M medium were submerged with 25 ml of liquid M medium for one hour, and then removed. The rinses were successively performed three times for one hour and one time overnight.

2.2.3.5 PCR verification of root transformation

Genomic and bacterial DNAs were respectively extracted from root samples and bacterial cells using commercial kits (DNeasy plant kit 69103 and DNeasy tissue kit 69504; Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). As selected lines were obtained after transformation with the *A. rhizogenes* A4 strain (carrot hairy root line (Bécard and Fortin, 1988), 4C4, 4C7 and 4C9) and with the ATCC 15834 strain (AJ3), the two bacterial strains were used as a positive control for PCR analysis. In negative controls, DNA samples were omitted. Negative and positive controls were included in all PCR amplifications. The oligonucleotide primers used were 5'-TAACATGGCTGAAGACGACC-3' and the reverse primer 5'-AAACTCGCACTCGCCATGCC-3' (Piñol *et al.*, 1999). PCR was done using the Taq

PCR Core kit (Quiagen Inc.) with 200 ng of template DNA, 0.4 μ M of each oligonucleotide primer, 200 μ M dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 u Taq DNA polymerase (Quiagen Inc.) and buffer supplied by the manufacturer (1/10 v/v) in a total volume of 25 μ l. PCR reactions were performed with a thermal cycler model Genius (Techne Cambridge Ltd, Cambridge, USA) programmed as follows: 1 denaturation cycle of 95°C for 5 min; 30 amplification cycles of 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1.5 min; a final extension cycle of 72°C for 5 min. After amplification, the reaction mixture was loaded on a 1% (w/v) agarose gel and stained with ethidium bromide. The expected size of the products was 0.53 kb.

2.2.4 Statistical analysis

Statistical analyses were done using General Linear Model procedures of SAS software (SAS Institute Inc., 1996). All the parameters measured during the characterization of the six selected lines were compared with analyses of variance, at each sampling date. The effect of *G. intraradices* on M medium was analysed for the three lines that were receptive to the fungus only, and for the six lines on modified M medium. *A posteriori* comparisons of the means were investigated with a Tukey's studentized range tests at 5% level of significance. All data were verified for normality and mycorrhizal colonization root length were submitted to rank transformation in order to normalize skewed distributions before ANOVA.

2.3 Results

2.3.1 Plant transformation and hairy root lines selection

Forty-eight *in vitro* hairy root lines derived from primary root tips were established, nine days after transformation with *Agrobacterium rhizogenes*. Among these 48 lines, 31 lines were obtained with the A4 strain, nine lines with ATCC 15834 and eight lines with R1000. After six weeks of culture, the 15 lines presenting the more stable growth characteristics were chosen (Table I). These lines displayed typical hairy root phenotype with high lateral branching. Geotropism was negative (AJ3, 4J6, 4S1 and RS3), positive (4C1, 4C4, 4C5, 4C7, 4C9, 4C10, 4V3 and RS1) or neutral (AS1, 4C6 and 4J4). Development of calluses was noticed for six lines (4C1, 4C5, 4C7, 4C10, 4J6 and 4S1) on solid M medium. Considering the fast growth rates on solid M medium as well as a slower ageing, eight lines (AJ3, 4C4, 4C5, 4C6, 4C7, 4C9, 4C10 and 4J6) were selected and inoculated with chlamydospores of *Glomus intraradices*. Spores germination of *G. intraradices* was observed with all the eight lines tested, among which three lines (4C4, 4C6 and 4C9) supported an external mycelium development after four weeks. Four lines, which showed the highest Petri dish invasion indice (Table I), and having either supported (4C4, 4C9) or not supported (AJ3, 4C7) *G. intraradices* external mycelium development were retained for further characterization and comparison with a non transformed tomato line and the carrot transformed root line.

Amplification of a 0.53 kb PCR fragment corresponding to the bacterial *rolC* gene was positive for the four selected transformed tomato lines, the carrot hairy roots,

the A4 bacterial strain (Fig. 1) and the ATCC 15834 bacterial strain (results not shown).

The *rolC* gene was not detected in the non-transformed tomato roots of the cv. Cobra.

Table I: Preliminary selection of transformed tomato root lines for further characterizations

Tomato root lines *	Solid M medium						Liquid M medium
	Growth †		Ageing		Mycorrhizal potential		Growth †
	PDI (%)	Geotropism ‡	Calluses	Yellowing §	Spore germ.	EMD	PDI (%)
AJ3	100	-	No	-	Yes	No	> 50
AS1	< 25	±	No	++	nd	nd	< 25
4C1	< 25	+	Yes	+	nd	nd	< 25
4C4	100	+	No	-	Yes	Yes	100
4C5	> 50	+	Yes	-	Yes	No	25-50
4C6	> 50	±	No	++	Yes	Yes	< 25
4C7	100	+	Yes	-	Yes	No	100
4C9	100	+	No	-	Yes	Yes	25-50
4C10	25-50	+	Yes	-	Yes	No	< 25
4J4	< 25	±	No	+	nd	nd	< 25
4J6	> 50	-	Yes	+	Yes	No	25-50
4V3	25-50	+	No	+	nd	nd	< 25
4S1	< 25	-	Yes	++	nd	nd	25-50
RS1	25-50	+	No	+	nd	nd	< 25
RS3	25-50	-	No	-	nd	nd	25-50

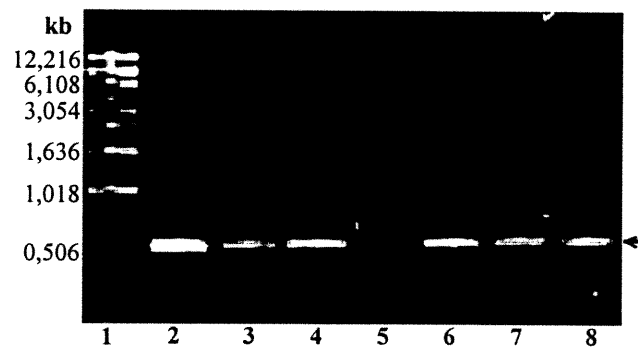
* The four lines selected for further characterizations are indicated in bold.

† Root growth was evaluated on solid (n=6) and liquid (n=3) M media, on a four classes scale: (< 25) Petri dishes invasion (PDI) lower than 25% after four weeks of culture, (25-50) PDI up to 50% after four weeks, (> 50) PDI over 50% after four weeks and (100) total PDI after two or three weeks. ‡ Geotropism of root lines was estimated as positive (+), negative (-) or not stable over replicates (±). § Ageing of root lines was

estimated with a three classes scale: (-) no yellowing of the roots after four weeks of culture, (+) yellowing of some roots after four weeks and (++) yellowing of the majority of roots after two weeks.

Mycorrhizal potential was evaluated (n=3) for the eight profusely growing lines (AJ3, 4C4, 4C5, 4C6, 4C7, 4C9, 4C10 and 4J6), in terms of *Glomus intraradices* spores germination (Spore germ.) and extraradical mycelial development (EMD) four weeks after fungal inoculation. nd = not determined.

Figure 1: PCR amplification of the *rolC* bacterial gene to verify the root lines transformation.

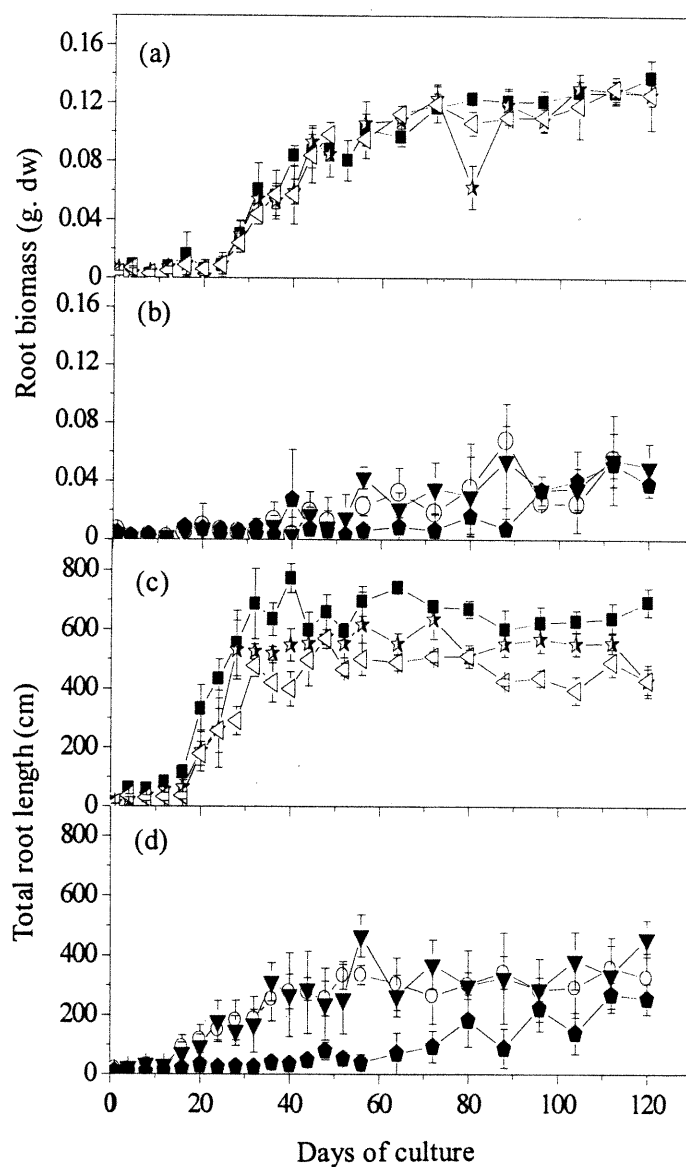


Agarose gel electrophoresis of PCR products from A4 bacterial strain and root lines genomic DNAs. Lane 1: molecular weight markers (kb). Lane 2: positive control, plasmid from *A. rhizogenes* A4; lane 3-4: hairy root lines AJ3 and 4C4; lane 5: non-transformed tomato cv. Cobra root line; lanes 6-8: hairy root lines 4C7, 4C9, and carrot hairy roots. The expected PCR product (0.53 kb) is indicated with an arrow to the right.

2.3.2 Growth, mycorrhizal receptiveness and nutrients uptake of the six selected lines

Growth rates of the different root lines were categorized into two groups: fast growing (FG) lines and slow growing (SG) lines. Growth of FG lines (Fig. 2a and 2c) can be depicted as an exponential growth, as represented by the AJ3 (\triangleleft ; $\mu=0.116 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.972$, between days 24 and 48), 4C4 (\blacksquare ; $\mu=0.138 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.935$, between days 20 and 40), and 4C7 lines (\star ; $\mu=0.114 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.908$, between days 24 and 44). After the lag phase, SG lines displayed a linear growth (Fig. 2b and 2d), and included the carrot hairy roots (\blacklozenge ; $\mu=0.037 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.792$, between days 56 and 112), 4C9 (\blacktriangledown ; $\mu=0.039 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.618$, between days 40 and 112) and Cobra tomato lines (\circ ; $\mu=0.025 \text{ d}^{-1}$, $R^2=0.561$, between days 28 and 112). The lag phase last a mean of 24 days for the FG lines, and at least 36 days for the SG lines. Overall, the root dry weights and lengths were significantly different between FG and SG lines after 28 days of culture ($P<0.001$), with the exceptions of day 40, when 4C7 and AJ3 dry weights were not significantly different from carrot hairy roots, and day 80, with 4C7 dry weight significantly lower than 4C4 and AJ3 ($R^2: 0.92$, $P=0.001$) but not different from 4C9 and Cobra lines (Fig. 2). Carrot hairy root lines had a root length significantly lower than the other SG lines between the days 28 and 88 of culture ($P<0.001$). The fresh weights of SG lines were significantly lower than the FG lines after 24 days of culture ($P<0.001$), and the carrot hairy root line fresh weight was also significantly lower than 4C9 and Cobra lines after 40 days ($P<0.001$) (data not shown). At stationary phase, root lengths of 4C4 and AJ3

Figure 2: Root biomass (g. dw) of (a) fast growing (FG) lines, (b) slow growing (SG) lines; (c) total root length (cm) of FG, and (d) SG lines, on minimal medium during a 4 months growth period. FG lines: AJ3 line \triangleleft , 4C4 line \blacksquare , 4C7 line \star . SG lines: 4C9 line \blacktriangledown , carrot hairy roots \blacklozenge , and cv. Cobra line \circ . Errors bars are 95% confidence intervals.



lines reached approximately $4,8 \text{ m} \pm 0,21 \text{ m}$ (SD), which was about two fold higher ($P < 0.001$) than for SG lines (Fig. 2b and 2d). Mycorrhizal colonization did not significantly change the growth rate of the receptive lines, neither for the FG line 4C4 nor for the SG lines 4C9 and carrot hairy root (data not shown).

On M medium, germination of *G. intraradices* chlamydospores was observed with the eight inoculated lines, during the preliminary selection (Table I). During the further characterization of the six selected lines, spores germination also occurred, two weeks after inoculation with all the lines. Root colonization was detected after 40 days of culture for three (4C4, 4C9 and carrot hairy roots) of the six evaluated lines (Fig. 3). No colonization was detected for the 4C7, AJ3 and Cobra lines. Root colonization of carrot hairy roots by *G. intraradices* on M medium increased rapidly between days 36 and 72, and reached about $25 \% \pm 3.35 \%$, which was significantly higher ($P < 0.01$) than that reached for the 4C4 and 4C9 lines (up to 8 % at the end of the culture), with exceptions for the day 56 at which time 4C4 colonization was not significantly different from carrot hairy roots, and day 88 when no difference was estimated between the three root lines colonization (Fig. 3).

The three FG lines (AJ3, 4C4 and 4C7) had similar nutritional behaviors. Inorganic phosphate (Pi) was the first nutrient to be depleted, before the beginning of the exponential growth phase. Pi concentration in the M medium was under the detection limit of HPLC after day 12 for 4C4 line (Fig. 4a) and after day 24 for AJ3 (Fig. 4c) and 4C7 lines (data not shown). Nitrate depletion occurred at the end of the exponential

Figure 3: Percentage of root colonization by *Glomus intraradices* of the three receptive lines on solid M medium during a four months growth period: 4C4 mycorrhizal line \square , 4C9 mycorrhizal line ∇ and carrot mycorrhizal line \diamond . Errors bars are 95% confidence intervals.

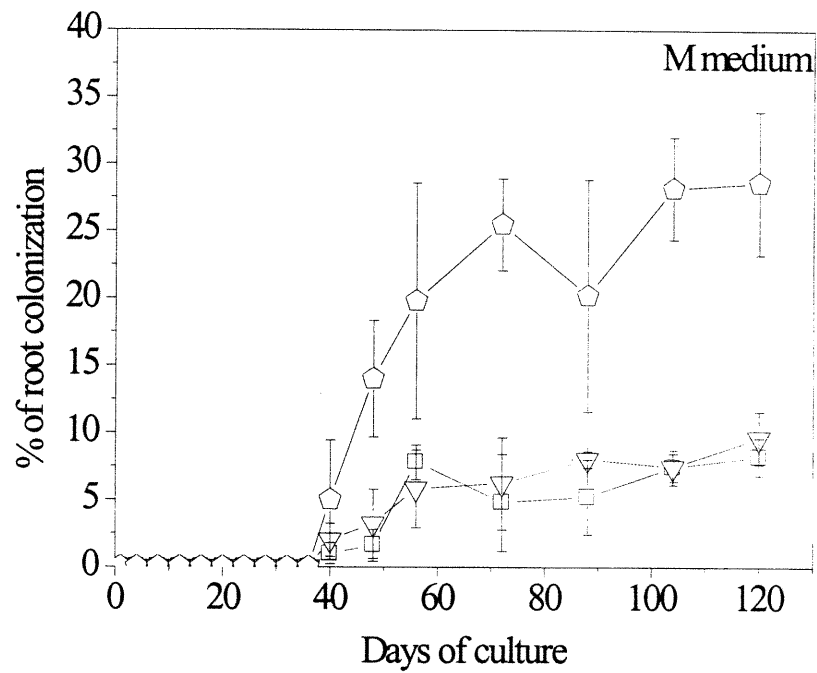


Figure 4: Inorganic phosphate Pi consumptions of FG and SG lines on M medium: 4C4 line (■) 4C9 line (▼), AJ3 line (◄) and carrot hairy root line (◆). Errors are interval of confidence 95%.

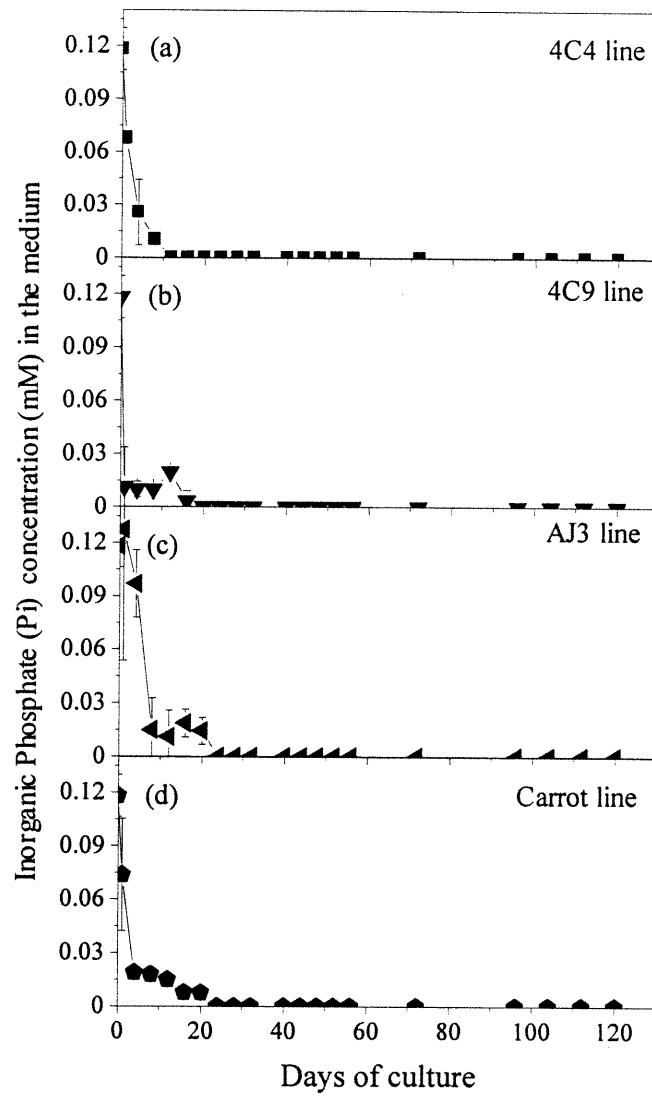


Figure 5. Inorganic nitrate NO_3 consumptions on M medium: 4C4 (a ■), 4C9 (b ▼), AJ3 (c ◀) and carrot hairy root (d ◆). Errors bars are 95% confidence intervals.

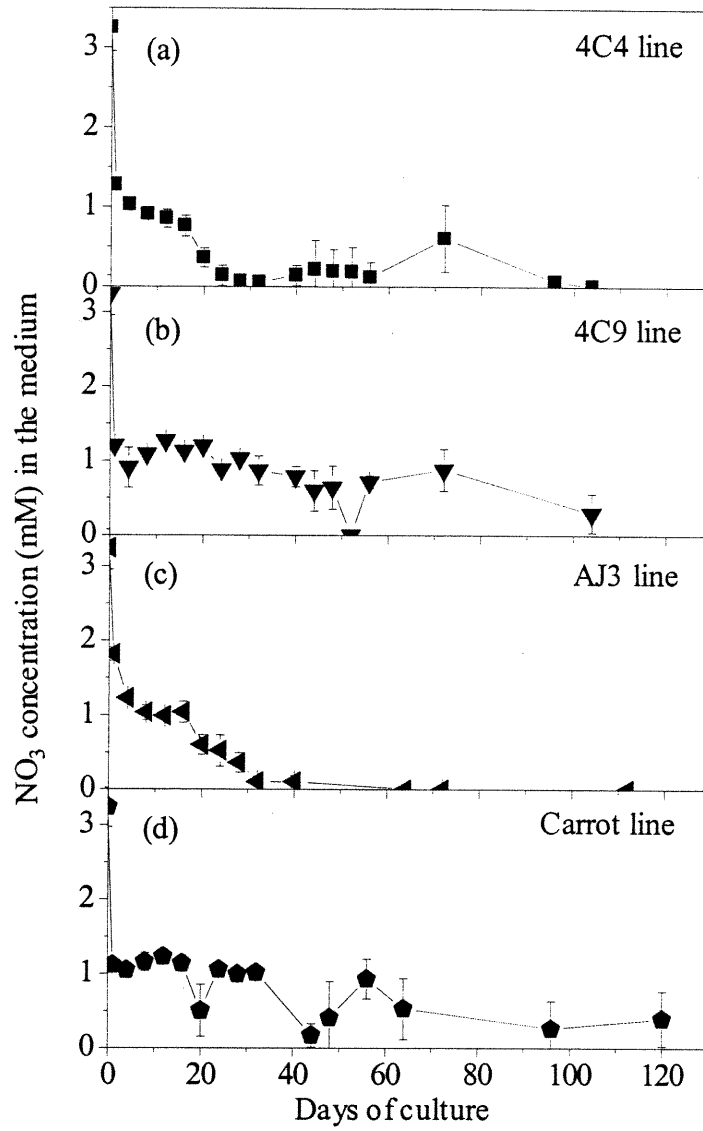
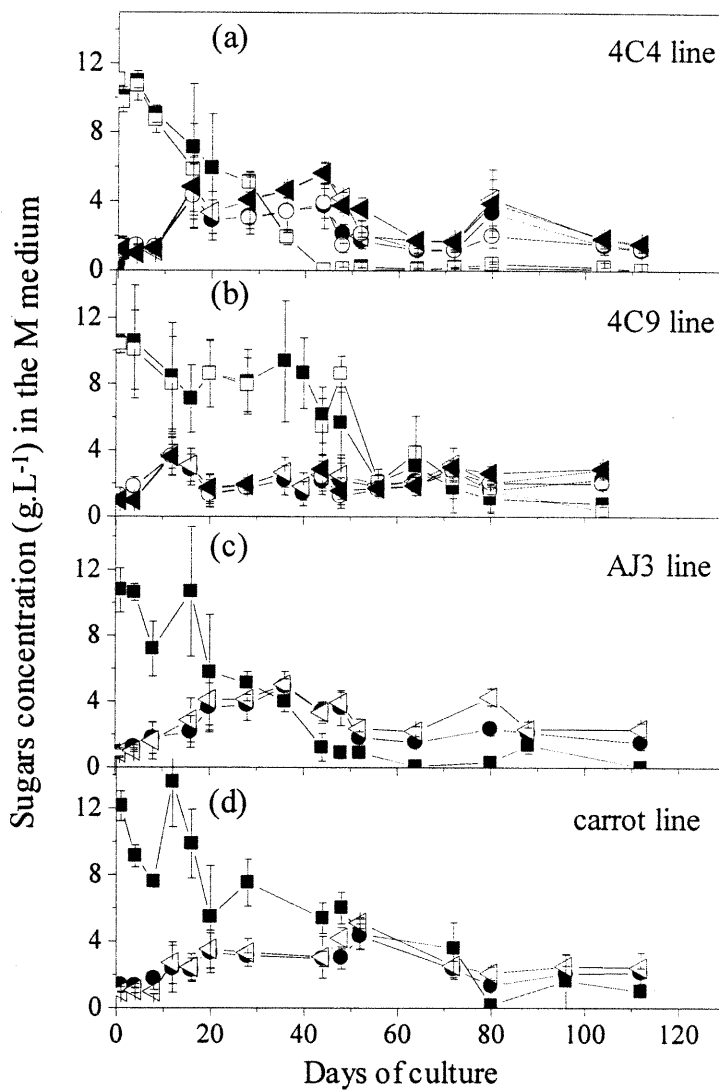


Figure 6: Carbohydrates consumption of root lines in relation with growth type and mycorrhizal colonization by *Glomus intraradices*. (a-b) Sucrose (\square), glucose (\circ) and fructose (\triangleleft) concentration of root lines. Sugars concentration of mycorrhizal (4C4, 4C9) lines are indicated with full symbols. Bars are interval of confidence 95%.



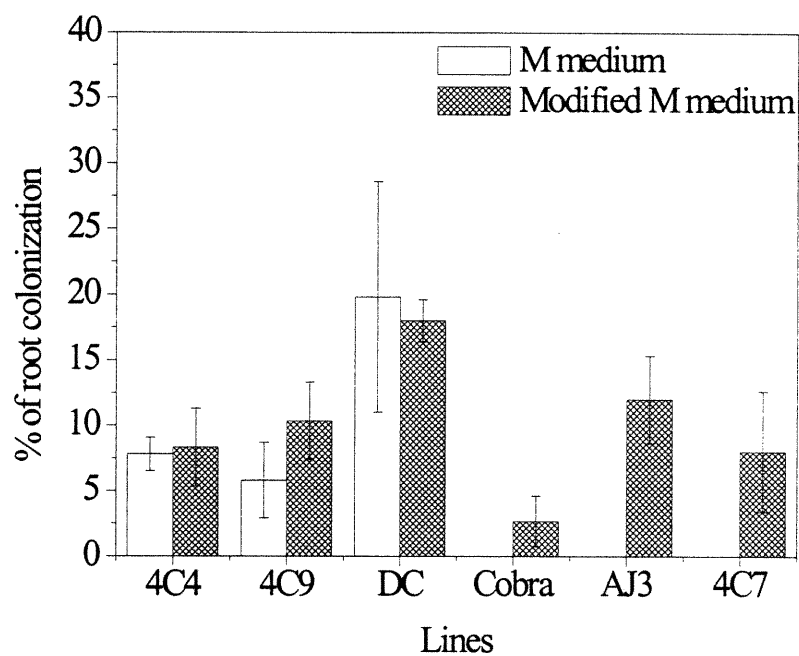
growth phase, after day 36 for 4C4 (Fig. 5a) and day 52 for the two FG non-receptive lines AJ3 (Fig. 5c) and 4C7 (data not shown). Sucrose was completely hydrolyzed only for the 4C4 line, within the first 44 days of culture (Fig. 6a). AJ3 (Fig. 6c) and 4C7 lines (data not shown) did not entirely deplete sucrose. Glucose and fructose were not completely depleted by any of the FG lines for the culture duration (Figs. 6a and 6c). The three SG lines (4C9, carrot hairy roots and cv. Cobra excised roots) completely consumed Pi before the growth (Figs. 4b and 4d), and the Pi uptake rates were similar to the AJ3 and 4C7 lines, but it was significantly different from 4C4 line after the day 12 ($P < 0.001$). Pi was depleted after the day 24 and was the only limiting element for those lines. Nitrate (Figs. 5b and 5d) and carbohydrates (Figs. 6b and 6d) were consumed without being exhausted from the medium. The consumption of the others nutrients (Cl^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) was not significantly different in time or between lines.

2.3.3 Effect of a reduction of initial Pi concentration of the culture medium on mycorrhizal receptiveness

A decrease of the Pi concentration in the M modified medium, in a second experiment, allowed *G. intraradices* to colonize all root lines, including the initially unreceptive ones (Fig. 7). Pi concentration was reduced to 0.032 mM instead of 0.118 mM in solid M medium. After eight weeks of co-culture, the percentages of root length colonized reached 2.5 % \pm 1.6 % for the Cobra line, to 8 % \pm 4.0 % for 4C7 and 12 % \pm 2.9 % for the AJ3 line. Root colonization was significantly higher for AJ3 and carrot hairy roots than 4C4, 4C7 and Cobra lines ($P = 0.0028$), while colonization of line 4C9

did not significantly differ from both groups. The root colonization of the initially receptive lines was not significantly different than that reached on M medium.

Figure 7: Percentage of root colonization of the six lines on solid M medium and on solid modified M medium, after 56 days of culture. The six lines were receptive on modified M medium, but only 4C4, 4C9 and carrot hairy roots established the symbiosis on M medium. Errors are 95% confidence intervals.



2.4 Discussion

2.4.1 Nutritional behavior and mycorrhizal responsiveness

Is the nutritional status of plants a cornerstone for the establishment of the symbiosis? It has been thoroughly reported that high concentrations of phosphate in the soil inhibit the formation of mycorrhizas (Smith and Read, 1997), but such observation was not always observed with *in vitro* studies: Mugnier and Mosse (1987) did not observe a significant effect of Pi concentration, from 0.1 to 1,25 mM in the culture medium, on mycorrhizal colonization of *Convolvulus sepium* hairy roots by *Glomus mosseae*. However, even if no clear experimental answer has been given concerning the exact relationship between the plant nutritional status and mycorrhizal receptiveness, Jolicoeur et al. (2002) proposed some hypotheses to model the phenomena: Pi intracellular storage ($P_{r,s}$) was proposed as a “decision switch”, representing an inhibitory signal to the fungus when $P_{r,s}$ of the roots has a non-zero value.

In this experiment, all the fast growing (FG) and slow growing (SG) lines were able to uptake Pi within the first 24 days of culture on M medium (Fig. 4). FG lines were more efficient than SG lines to acquire nutrients as shown with the rapid disappearance of phosphate and nitrate from the medium. Mycorrhizal effectiveness of tomato lines was thus not related to the ability to absorb phosphate, nitrate or to hydrolyze sucrose. Lines showing similar growth and nutrients uptake rates either did or did not responded to *G. intraradices* on M medium. Plant cells are able to store a huge amount of nutrients within the intracellular compartments and nutrient uptake rates gave little information on real nutrient utilization rate of the roots. Obviously, analysis of metabolic efficiency

and intracellular nutrient pool management of roots lines will be another fundamental step to characterize the nutritional behavior of the lines. Differences in internal metabolism and storage of nitrogen and phosphate could certainly be related to the receptiveness to mycorrhizal fungi, particularly intracellular Pi pools that are thought to be a critical parameter in symbiosis regulation (Jolicoeur, 1998; Jolicoeur *et al.*, 2002).

Actually, tomato lines affinity to *G. intraradices* was increased when the initial Pi concentration was lowered from 0,118 mM to 0.032 mM in the modified M medium (Fig 7), that is only 27 % of usual Pi content in the M medium using 0.4% of Gel-Gro (Doner and Douds, 1995; Jolicoeur *et al.*, 2002). On the modified M medium, initially unreceptive tomato lines successfully established the symbiosis and the lines that were previously receptive on M medium showed a slight but not statistically significant increased level of intraradical colonization (Fig 7). Even if initial Pi availability has been reported to influence the symbiosis *in vitro* between carrot hairy roots and *Gigaspora margarita* (Bécard and Fortin, 1988), the exact role of Pi in the establishment of mycorrhizal symbiosis remains unclear. The lower availability of Pi in the modified M medium and the rapid Pi uptake from the medium might have triggered the symbiosis establishment. Nevertheless, the disappearance of Pi during the culture on M medium did not give the same outcome. Moreover, nitrogen and sucrose level were reported to be more critical than Pi concentration during *in vitro* infection processes (Mugnier and Mosse, 1987), as well as relative concentrations of sucrose, Pi and Na₂SO₄ (Bécard and Fortin, 1988).

In fact, Pi is involved in the regulation of several metabolic pathways and enzyme reactions (Theodorou and Plaxton, 1995), and is considered as a key component

of metabolism (Schachtman *et al.*, 1998). Modifications of environmental factors like Pi availability drastically change the internal metabolism, such as the carbohydrate metabolism. Pi availability in the environment could be considered an indirect indicator of mycorrhizal receptiveness, but strictly depending on the intracellular storage level of Pi (Jolicoeur *et al.*, 2002), and even more during Pi starvation periods: Street & Lowe (1950) studied the carbohydrate nutrition of excised tomato roots in White's medium, and demonstrated an intimate correlation between sucrose absorption and intracellular phosphorus cycle, but not with the external Pi concentration. However, during short periods of Pi starvation, vacuolar Pi is released into the cytoplasm, in order to increase Pi concentration in the metabolically active compartments (Theodorou and Plaxton, 1995) and the rate of sugar absorption becomes dependent on Pi concentration in the culture medium (Street and Lowe, 1950). Recent molecular analysis of Pi starvation-induced gene expression indicates that several genes are activated in roots under Pi starvation (Raghothama, 1999). *Mt4* is a P-starvation inducible gene that is down regulated in the early stages of the symbiosis, at once by phosphate and by unidentified molecules of mycorrhizal fungi (Burleigh and Harrison, 1997).

What will happen during extended periods of Pi starvation is unclear and such nutritional stress could cause a drastic modification of root exudates, which constitute a key factor in the establishment of the symbiosis. Graham *et al* (1981) determined that plant root exudation of amino acids and reduced carbohydrates was increased on P-deficient soil, and correlated to a higher root colonization level by *Glomus fasciculatus*. Moreover, in our experiments, the M medium modification with rinses has re-equilibrated the pH of the medium at 5.5, since the pH of the M medium was normally

adjusted before autoclaving. Re-equilibration of the pH may have modified the availability of some forms of metabolites exuded. Root exudates act as signals into the surrounding environment of roots, and are implicated in numerous mechanisms to prevent plant stresses. Root exudates composition is wide (Crowley and Rengel, 1999; Uren, 2001) and includes compounds that stimulate branching of AM fungi (Ratnayake *et al.*, 1978; Graham *et al.*, 1981; Bécard and Piché, 1989, 1990; Nagahashi *et al.*, 1996; Nagahashi and Douds, 2000). It was well established that non-mycotrophic and mycotrophic plants release different compounds (Schwab *et al.*, 1983; Pinior *et al.*, 1999). Molecules responsible in fungal stimulation are thought to be hydrophobic and low-molecular weight but not flavonoids (Buée *et al.*, 2000; Fortin *et al.*, 2002). Hydrophobic root exudates produced by roots grown on P-deficient medium (Tawaraya *et al.*, 1998) stimulated growth of AM fungi prior to colonization (Douds and Nagahashi, 2000). Moreover, the absence of aerial parts in hairy roots demanded the addition of sugars as an offset to photosynthetic products (Fortin *et al.*, 2002). Such addition could also modify the root exudation. In our experiment, we can postulate that lower initial Pi availability in the medium may have modified root exudation of the lines, triggering the establishment of mycorrhizas.

2.4.2 *Agrobacterium rhizogenes* transformation and root line genotype

Bacterial transformation with *A. rhizogenes* is thought to have an effect on hairy root lines genotype expression, but this effect was not sufficient to explain the variability of response towards *G. intraradices*. Mycorrhizal affinity of tomato hairy

root lines was directly related to the level of available Pi at the beginning of the culture rather than to a Pi stress suffered during the culture.

The transformed status of hairy root lines implicates a possible modification of the genotype. Transformation of four tomato cultivars with three strains of *A. rhizogenes* produced 48 lines, of which 31 were viable on solid M medium. Cobra and Joker tomato cultivars were the more susceptible to bacterial transformation, allowing the establishment of 15 and 16 lines respectively. A4 was the most virulent *A. rhizogenes* strain leading to the majority of stable hairy root lines over time. The cv Cobra showed the higher susceptibility towards the A4 strain (e.g. 4C4, 4C7 and 4C9). Considering the absence of growth and the lack of stability (yellowing of roots, development of calluses) of lines over time, integration of the bacterial plasmid was probably non-stable over time for the majority of the Joker lines (except AJ3), and it was even less stable for the Springfield and Vendor's lines. Plant cultivars and *A. rhizogenes* strains specificity has previously been noticed and the hairy root lines obtained after *A. rhizogenes* transformation had singular behavior (Porter, 1991; Giri and Narasu, 2000). The physiology of hairy roots differed significantly with regards to growth rate and secondary metabolite production as described for legumes (Gelvin, 2000), solanums (Joao and Brown, 1994; Simoneau *et al.*, 1994), *Catharanthus roseus* (Brillanceau *et al.*, 1989) and other plants.

The present results underlined that tomato cultivars had a different sensibility to *A. rhizogenes* strains. Moreover, stability of the transformation over time was also dependent on the cultivar and bacterial strain combination. Integration site and copy numbers of bacterial Ri-T-DNA plasmid inside the plant genome could be involved. T-

DNA integration was shown to be random and multiple copies of T-DNA are often inserted (Tinland, 1996). Chilton et al. (1982) reported that the integration of T-DNA into the plant genome was stable over time. However, expression of introduced genes and phenotypes could be lost (Tepfer, 1984), like *aux2* and opine synthetic genes throughout subcultures (Guivarc'h et al., 1999). The *rolC* gene, which code for a cytokinin- β -glucosidase (Chriqui et al., 1996), was chosen to verify the transformed status of our lines, because the *rol* genes are steadily expressed in 100 % of hairy roots (Moyano et al., 1999; Piñol et al., 1999). In fact, exact relationships between plasmid integration and phenotypes of lines remains to be elucidated. Bacterial genes are integrated within preferential DNA sequences whose expressions are not vital for the plant, but it could occur within sequences whose expression are implicated in essential metabolic pathways (Meyer et al., 2000). In our experiments, mycorrhizal susceptibility differed between tomato root lines and no direct correlation was found between tomato cultivar/bacterial strain combination and receptiveness to *G. intraradices*. Further molecular analyses have to be done to understand the genetic basis involved in mycorrhizal susceptibilities of the studied lines.

Mycorrhizal dependency of tomato lines was low in the *in vitro* conditions and therefore growth rates were not significantly different between mycorrhizal and non-inoculated lines. The *in vitro* culture in Petri dishes is an enclosed space where nutrients are more available than in natural conditions. Therefore, the dependency of root lines to the AM fungus was underestimated in those culture systems. The concentration and the total availability of nutrients are the parameters that could influence the behavior of the

symbiots in *in vitro* conditions (Jolicoeur *et al.*, 2002). However, our observations on tomato hairy roots are concomitant with previous studies done on tomato plants: tomato mycorrhizal dependency was low (Plenchette *et al.*, 1983; Caron *et al.*, 1985), and root colonization of excised tomato roots reached only 10 % after five months of *in vitro* dual culture with *Glomus intraradices* (Chabot *et al.*, 1992). Mycorrhizal colonization rates of tomato lines were always lower than carrot hairy roots in those experiments and as in the present experiment, carrot hairy roots had also the lowest growth rates. Such results could be related to a lower metabolic efficiency of the carrot hairy roots, which will increase the dependency on the symbiosis, since both partners necessitated its establishment. The percentage of root colonization is an indicator of development of the AM fungi inside the cortical cells of the host root. Arbuscules and vesicles reflect the biological activity between the two partners, but the real importance of the intracellular spread remains unclear in term of interactions with the mycorrhizosphere. Actually, many studies underlined that bioprotection of mycorrhizal plants was not strictly dependant on high level of root colonization (Smith and Read, 1997).

In conclusion, our results suggest that mycorrhizal receptiveness may be mainly correlated to the initial Pi availability in the medium for tomato root lines. Nutrient uptake rates were not directly related to the sensitivity of tomato root lines towards *G. intraradices*. Although root lines were more receptive to mycorrhizal colonization when the initial Pi was decreased, the intracellular storage and utilization efficiency of internal nutrients should be elucidated. In the context of this result, the root lines that were initially non-receptive to mycorrhizal symbiosis should be revisited by lowering initial

Pi concentration and maybe of other nutrients from the culture medium. Advanced knowledge in phosphate metabolism will be a breakthrough to understand the root metabolism prior to colonization, including modification of root exudates. NMR studies already showed differences in the Pi intracellular pools between non-mycorrhizal and mycorrhizal cucumber roots (Rasmussen *et al.*, 2000). Moreover the stability of behavior of tomato lines and their high susceptibility to nutritional depletion will allow further analysis of the nutritional impact for the symbiosis, at the physiological and molecular levels.

2.5 Acknowledgements

We would like to thank L. Lamboursain for her HPLC assistance and helpful discussions, C. Tikhomiroff for his advice on bacterial transformation, Dr P. Koonjul for her advice on PCR verifications and S. Daigle for his statistical analyses. The HPLC system used for sugar analysis was purchased with a grant from the National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to M. Jolicoeur. This research was supported by the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and by the NSERC operating grants to M. Jolicoeur and M. St-Arnaud.

2.6 References

- Bago, B., Azcón-Aguilar, C. and Piché, Y. 1998. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*, **90**: 52-62.
- Bago, B., Pfeffer, P. E. and Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* **124**: 949-957.
- Bécard, G. and Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Bécard, G. and Piché, Y. 1989. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* **112**: 77-83.
- Bécard, G. and Piché, Y. 1990. Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Can. J. Bot.* **68**: 1260-1264.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. and Barker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for studying nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 693-700.
- Bouchard-Marchand, É. 2000. Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture *in vitro*. M. Sc thesis. Department of chemical engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Q.C.

- Brillianceau, M. H., David, C. and Tempé, J. 1989. Genetic transformation of *Catharanthus roseus* G. Don by *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Rep. **8**: 63-66.
- Bryla, D. R. and Koide, R. T. 1998. Mycorrhizal response of two tomato genotypes relates to their ability to acquire and utilize phosphorus. Ann. Bot. **82**: 849-857.
- Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. and Bécard, G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. Mol. Plant-Microbe Interact. **13**: 693-698.
- Burleigh, S. H. and Harrison, M. J. 1997. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. Plant Mol Biol. **34**: 199-208.
- Caron, M., Fortin, J. A. and Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. Plant Soil, **87**: 233-239.
- Chabot, S., Bécard, G. and Piché, Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. Mycologia, **84**: 315-321.
- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. Nature, **295**: 432-434.
- Chriqui, D., Guivarc'h, A., Dewitte, W., Prinsen, E. and Van Onkelen, H. 1996. *Rol* genes and root initiation and development. Plant Soil, **187**: 47-55.

- Crowley, D. E. and Rengel, Z. 1999. Biology and chemistry of nutrient availability in the rhizosphere. *In* Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications. *Edited by* Food Products Press, USA. Binghamton. pp. 1-40.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, É. and Gianinazzi, S. 1998. Do Pathogenesis-related (Pr) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* **52**: 167-183.
- Declerck, S., Strullu, D. G. and 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, T. A., Plenchette, C. and Strullu, D. G. 1994. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis*, **17**: 217-227.
- Dodd, J. C. 2000. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro- and natural ecosystems. *Outlook Agr*, **29**: 55-62.
- Doner, L. W. and Douds, D. D. 1995. Purification of commercial gellan to monovalent cation salts in acute modification of solution and gel-forming properties. *Carbohydrate Res.* **273**: 225-233.
- Douds, D. D. and Nagahashi, G. 2000. Signaling and recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. *In* Current advances in mycorrhizae research. *Edited by* Podila, G. K. and Douds, D. D. American Phytopathological Society. St Paul. pp. 11-18.

- Filion, M., St-Arnaud, M. and Fortin, J. A. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol.* **141**: 525-533.
- Fortin, J.A., St-Arnaud, M., Hamel, C., Chavarie, C., Jolicoeur, M. 1996. Aseptic *in vitro* endomycorrhizal spore mass production. United States patent, no. 5,554,530.
- Fortin, J. A., Bécard, G., Declerck, S., Dalpé, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. and Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.* **80**: 1-20.
- Gelvin, S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 223-256.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* **84**: 489-500.
- Giri, A. and Narasu, M. L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22.
- Graham, J., Leonard, R. and Menge, J. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant physiol.* **68**: 548-552.
- Grayston, S. J., Vaughan, D. and Jones, D. 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants - The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *App. Soil Ecol.* **5**: 29-56.

- Guivarc'h, A., Boccara, M., Prouteau, M. and Chriqui, D. 1999. Instability of phenotype and gene expression in long-term culture of carrot hairy root clones. *Plant Cell Rep.* **19**: 43-50.
- Joao, K. H. L. and Brown, T. A. 1994. Long-term stability of root cultures of tomato transformed with *Agrobacterium rhizogenes* R1601. *J. Exp. Bot.* **45**: 641-647.
- Jolicoeur, M. 1998. Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs. PhD thesis. Department of chemical engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Q.C.
- Jolicoeur, M., Bouchard-Marchand, É., Bécard, G. and Perrier, M. 2002. Regulation of mycorrhizal symbiosis: Development of a structured nutritional dual model. *Ecol. Model.* In press.
- Jolicoeur, M., Germette, S., Gaudette, M., Perrier, M. and Bécard, G. 1998. Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi - A symbiotic physiological marker. *Plant Physiol.* **116**: 1279-1288.
- Jolicoeur, M., Williams, R. D., Chavarie, C., Fortin, J. A. and Archambault, J. 1999. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 224-232.
- Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A. and Piché, Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza*, **12**: 37-42.
- Khaliq, A. and Bagyaraj, D. J. 2000. Colonization of arbuscular-mycorrhizal fungi on Ri T-DNA transformed roots in synthetic medium. *Indian J. Exp. Biol.* **38**: 1147-1151.

- Kormanik, P. P. and McGraw, A. C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. *In* Methods and principles of mycorrhizal research. Edited by Schenck, N. C. American Phytopathological Society. St Paul. pp. 37-45.
- Marschener, H. 1998. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Res.* **56**: 203-207.
- Meyer, A. D., Tempe, J. and Costantino, P. 2000. Hairy roots: A molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 93-139.
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bonfill, M., Morales, C. and Piñol, M. T. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, **52**: 1287-1292.
- Mugnier, J. and Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*, **77**: 1045-1050.
- Nagahashi, G. and Douds, D. D. 2000. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* **104**: 1453-1464.
- Nagahashi, G., Douds, D. D. and Abney, G. D. 1996. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza*, **6**: 403-408.

- Nauerby, B., Billing, K. and Wyndaele, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* **123**: 169-177.
- Nuutila, A. M., Vestberg, M. and Kauppinen, V. 1995. Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Rep.* **14**: 505-509.
- Pinior, A., Wyss, U., Piché, Y. and Vierheilig, H. 1999. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Can. J. Bot.*, **77**: 891-897.
- Piñol, M., Palazon, J., Cusido, R. M., C. and Ribo, M. 1999. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Sci.* **141**: 41-49.
- Plenchette, C., Fortin, J. A. and Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil*, **70**: 199-209.
- Porter, J. 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**: 387-421.
- Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, É. and Barea, J. M. 1999. Beta-1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci.* **141**: 149-157.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**: 665-693.

- Rasmussen, N., Lloyd, D. C., Ratcliffe, R. G., Hansen, P. E. and Jakobsen, I. 2000. P-31 NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **226**: 245-253.
- Ratnayake, M., Leonard, R. and Menge, J. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol*, **81**: 543-552.
- SAS Institute Inc. 1996. *The SAS System for Windows 95, release 6.12*. SAS Institute Inc. Cary, N.C.
- Schachtman, D. P., Reid, R. J. and Ayling, S. M. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol*. **116**: 447-453.
- Schreiner, R. P. and Bethlenfalvay, G. J. 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotech*. **15**: 271-285.
- Schwab, S. M., Leonard, R. T. and Menge, J. A. 1983. Quantitative and qualitative comparison of root exudates of mycorrhizal and nonmycorrhizal plant species. *Can. J. Bot*. **62**: 1227-1231.
- Simoneau, P., Louisy-Louis, N., Plenchette, C. and Strullu, D. G. 1994. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Appl. Environ. Microbiol*. **60**: 1810-1813.
- Smith, S. A. and Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego.

- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. and Fortin, J. A. 1995a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. *In* La symbiose mycorhizienne - État des connaissances. Edited by Fortin, J. A., Charest, C. and Piché, Y. Éditions Orbis. Frelighsburg, Qc. pp. 51-87.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1995b. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza*, **5**: 431-438.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1996. Enhanced hyphal and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* **100**: 328-332.
- Steinberg, C., Whipps, J. M., Wood, D. A., Fenlon, J., Alabouvette, C. 1999. Effects of nutritional sources on growth of one non-pathogenic strain and four strains of *Fusarium oxysporum* pathogenic on tomato. *Mycol. Res.* **103**: 1210-1216
- Street, H. E. and Lowe, J. S. 1950. The carbohydrate nutrition of tomato roots II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Ann. Bot.*, **14**: 307-329.
- Sunilkumar, G., Vijayachandra, K. and Veluthambi, K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction. *Plant Sci.* **141**: 51-58.
- Tatsumi, J., Yamauchi, A. and Kono, Y. 1989. Fractal analysis of plant root systems. *Ann. Bot.* **64**: 499-503.

- Tawarayama, K., Hashimoto, K. and Wagatsuma, T. 1998. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, **8**: 67-70.
- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, **37**: 959-967.
- Theodorou, M. and Plaxton, W. 1995. Adaptation of plants respiratory metabolism to nutritional phosphate deprivation. *In* Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation. *Edited by* Smirnoff, N. BIOS Scientific Publishers, Ltd. pp. 79-109.
- Tinland, B. 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**: 178-184.
- Toussaint, J. P. 2002. Nitrogen transfer and assimilation in a mycorrhizal *in vitro* root culture system. M. Sc thesis. Department of biology, University of Ottawa, Ottawa, O.N.
- Uren, N. C. 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *In* The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil plant interface. *Edited by* Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. Dekker, M. Editions. New York. pp. 19-40.
- Van Der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**: 69-72.

Chapitre 3

Conception d'un système multicompartimenté

3.1 Introduction

L'établissement de la symbiose EVA modifie favorablement l'inter-relation de la plante avec son environnement biologique et physico-chimique. Les plantes mycorhizées sont en général moins sensibles aux stress biotiques et abiotiques (Subramanian *et al.*, 1995; Subramanian and Charest, 1999; Dodd, 2000). Elles développent des résistances lorsqu'elles sont agressées par des champignons, des bactéries ou des nématodes et l'impact de ces maladies est significativement réduit (Bagyaraj *et al.*, 1979; Dehne, 1982; Benhamou *et al.*, 1994; Fitter and Garbaye, 1994; Dassi *et al.*, 1996; Dumas-Gaudot *et al.*, 1996). Cependant, une plante mycorhizée peut être plus sensible aux maladies provoquées par des champignons pathogènes foliaires et le nombre de particules virales semble augmenter dans les feuilles et les racines de plantes mycorhizées infectées par des virus (St-Arnaud *et al.*, 1995a).

Les mécanismes impliqués dans ce biocontrôle ne sont pas encore clairement définis. Ils semblent se regrouper en quatre grandes catégories : amélioration de la nutrition, stimulation des mécanismes de résistance de la plante hôte, interaction directe entre le champignon EVA et le parasite, et action indirecte du champignon EVA par une modification quantitative et qualitative de la microflore tellurique (St-Arnaud *et al.*, 1995a; Blee and Anderson, 2000). De nombreuses études montrent l'influence des

mycorhizes sur les populations microbiennes du sol et celle des exsudats dans la mycorrhizosphère et l'hyphosphère (Ames *et al.*, 1984; Bansal and Mukerji, 1994; St-Arnaud *et al.*, 1995b; Olsson *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 1998; Fillion *et al.*, 1999). Cependant, les mécanismes régulant ces changements sont actuellement peu connus, la principale difficulté demeurant la culture du champignon EVA sans la présence de la plante hôte. De ce fait, il est encore impossible de préciser si les effets de modifications de la microflore tellurique résultent du métabolisme de la plante, de celui du champignon ou bien des deux partenaires de la symbiose.

3.2 Objectifs

Pour essayer de décrire l'ampleur du rôle potentiellement joué par chacun des partenaires de la symbiose, il a été proposé de développer un système modèle compartimenté simulant la mycorrhizosphère et permettant la séparation physique des différentes parties de la symbiose, à savoir :

(a) la mycorhize entière, soit le système racinaire colonisé par le champignon EVA, avec la présence des structures internes (vésicules, arbuscules et hyphes intraracinaires) et externes de la symbiose (le mycélium extraradriculaire fongique),

(b) une partie du même système racinaire sans la présence extraradriculaire du champignon EVA, mais aux connections racinaires actives avec la partie décrite en (a)

(c) la phase extramatricielle du champignon EVA, soit le mycélium avec les hyphes et les spores,

(d) une zone sans la présence physique des deux intervenants mais où les exsudats de la partie (c) pourraient diffuser librement. Cette zone pourra être développée dans un quatrième compartiment ou bien au sein de chacun des trois autres compartiments.

Les parties (a) et (c) ont déjà été réalisées avec succès par St-Arnaud et al. (1996) en boîte de Petri à deux compartiments.

Le but de cette expérimentation est de comprendre quelle partie de la symbiose interagit avec l'environnement immédiat et par quel moyen le ou les partenaires interviennent. Dans ce cadre, il nous était nécessaire de fixer deux aspects essentiels : 1) les connections entre les différentes parties de la symbiose devaient rester actives, 2) les molécules potentiellement exsudées par chacun des partenaires ne devaient pas pouvoir diffuser entre les compartiments. Plusieurs types de compartimentations sont envisageables, à savoir une compartimentation physique, chimique, biologique et/ou temporelle. La mise au point de ce système reste très loin de la réalité écologique. C'est la raison pour laquelle nous avons opté pour une approche de compartimentation physique et nutritionnelle, en éliminant tout agent chimique supplémentaire qui pourrait provoquer un artefact supplémentaire et fausser la relation entre les deux organismes vivants.

3.3 Matériels et méthodes

3.3.1 Matériel végétal et fongique

Inocula racinaires :

Cette deuxième partie a été réalisée en parallèle de l'expérience présentée au chapitre 2. Les racines transformées de carotte ont été utilisées alors que les lignées de racines transformées de tomate n'étaient pas encore disponibles ou caractérisées.

Les racines transformées de carotte par l'ADN-T d'*Agrobacterium rhizogenes* A4 ont été utilisées pour le système de compartimentation en boîtes de Petri. Cette lignée racinaire a été initialement établie par Bécard et Fortin (1988) et elle est maintenue en culture aseptique *in vitro* sur un milieu nutritif complet, le milieu M, dont la composition est décrite dans le tableau II. La lignée de racines transformées de tomate 4C4, dont les protocoles de transformation et de caractérisation ont été décrits dans le chapitre 2 de ce mémoire, ont été utilisées pour les tests de compartimentation en bioréacteur de type cuvée.

Les cultures racinaires étaient incubées à 26 °C, dans le noir et les boîtes de Petri contenant les racines transformées étaient placées selon le géotropisme des racines : les cultures de racines de carotte ont un géotropisme négatif et sont retournées à l'envers, alors que les racines de la lignée de tomate 4C4 ont un géotropisme positif et sont donc disposées à l'endroit. Les cultures étaient repiquées sur milieu M frais tous les deux à trois mois.

Champignon EVA: Le *Glomus intraradices* Schenk & Smith (DAOM 181602) est co-cultivé en routine avec des racines de carotte transformées, dans un système de culture *in vitro* à deux compartiments, mis au point au laboratoire (St-Arnaud *et al.*, 1996). Les spores étaient co-cultivées pendant trois mois sur des racines de carotte préalablement aux expériences et récupérées comme décrit dans le chapitre 2 (voir *Materials and methods, Preliminary selection of transformed tomato root lines*)

3.3.2 Méthodes expérimentales

3.3.2.1 Compartimentation en boîte de Petri

Le premier système de compartimentation testé fut une boîte de Petri à trois compartiments (Fig. 8). Chaque compartiment contenait 7,5 mL d'un milieu spécifique basé sur la littérature, qui permettrait de confiner la mycorhize, soit l'association des deux partenaires dans le compartiment 1, le champignon EVA dans le compartiment 2 et les racines transformées dans le compartiment 3. La composition des trois milieux est décrite dans le tableau III.

Trois inoculations différentes ont été testées en boîte de Petri :

- (a) un bloc de gélose (1 x 2 x 0.5 cm) contenant des racines mycorhizées de carotte par le *Glomus intraradices*, a été inoculé dans le compartiment 1,
- (b) Cinq parties apicales de racines transformées de carotte de 3 cm de longueur ont été placées à cheval entre les compartiments 1 et 3 avec l'inoculation d'environ 20 spores du champignon EVA dans le compartiment 1,

(c) Cinq parties apicales de racines transformées de carotte de 3 cm de long ont été placées à cheval entre les compartiments 1 et 3 avec l'inoculation d'un bloc de gélose (1 x 1x 0.5 cm) contenant du mycélium actif, branché sur une racine de carotte. Le bloc de mycélium était ôté du système expérimental dès que le champignon entrainait en contact avec les apex racinaires inoculés.

Pour les tests de compartimentation (a) et (b), 10 boîtes de Petri ont été inoculées, et 20 boîtes de Petri pour le test (c).

Tableau II : Composition du milieu de culture des racines transformées *in vitro*, le milieu M (Bécard and Fortin, 1988). La concentration en mM est indiquée pour les éléments importants (KNO₃, KH₂PO₄, Ca(NO₃)₂·4H₂O, saccharose).

Élément chimique	Concentration (mg.L ⁻¹)	Concentration (mM)
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	731	
KNO₃	80	0.79
KCl	65	
KH₂PO₄	4.8	0.12*
Ca(NO₃)₂·4 H₂O	288	1.219
Saccharose	10 000	29.21
NaFe EDTA	8	
KI	0.75	
MnCl ₂ , 4 H ₂ O	6	
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	2.65	
H ₃ BO ₃	1.5	
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.13	
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.0024	
Glycine	3	
Thiamine	0.1	
Pyridoxine	0.1	
Acide nicotinique	0.5	
Myo-inositol	50	

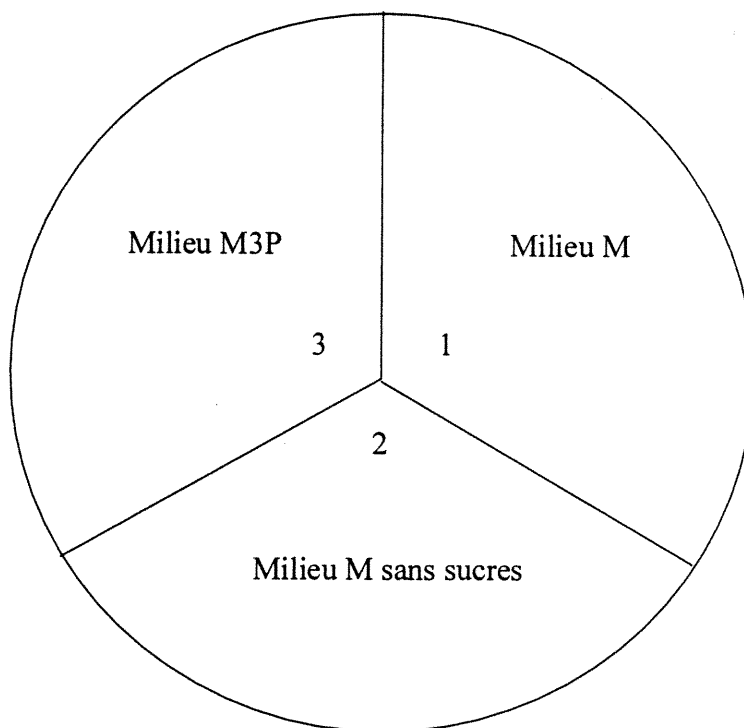
* La concentration en KH₂PO₄ est la concentration réelle obtenue après ajout du Gel Gro, l'agent gélifiant. La concentration en phosphate est augmentée de 0,085 mM avec le Gel Gro.

Tableau III: Composition des milieux des différents compartiments dans la culture en boîte de Petri à trois compartiments.

Organisme souhaité	Milieu de culture	Concentration en phosphate inorganique	Compartiment
La symbiose mycorhizienne	Milieu M	0.12 mM	1
<i>Le Glomus intraradices</i>	Milieu M sans sucres	0.12 mM	2
Les racines transformées de carotte	Milieu M3P *	0.36 mM	3

* Milieu M3P : Milieu dont la concentration en PO_4^{3-} est trois fois plus élevée que celle du milieu M

Figure 8 : Système de compartimentation en boîte de Petri, dont la composition de chaque compartiment est liée à l'organisme (1 : les deux partenaires de la symbiose ; 2 : le champignon EVA ; 3 : les racines transformées seules).



3.3.2.2 Compartimentation en système de bioréacteur

Le deuxième système testé fut basé sur une approche de compartimentation nutritionnelle, avec des distances physiques plus importantes pour les différents partenaires de la symbiose. Différents modèles ont été envisagés, mais seule la conception finale retenue est décrite ci-dessous.

La compartimentation nutritionnelle a été orientée autour des trois éléments clefs de la nutrition, à savoir la source en azote (NO_3^- et NH_4^+), phosphate (PO_4^{3-}) et carbone (saccharose). Le milieu de référence est le milieu M. Un gradient de concentration d'un nutriment a été réalisé dans chacun des systèmes testés. Au final, six systèmes de bioréacteurs ont été préparés, plus un système témoin où tous les milieux étaient le milieu M. Trois réplicats par système ont été mis en place, soit un total de 21 bioréacteurs. La composition des différents milieux est indiquée dans le tableau IV. Chacun des bioréacteurs (Figs. 9 et 10), de diamètre externe de 10.9 cm, était composé des 9 tubes (A à I) à scintillations, au volume individuel de 25 mL, placés à la périphérie ; au centre du bioréacteur était disposé un cylindre vide en Teflon® dépassant de 4 cm environ l'ouverture des tubes à scintillation. Une feuille de Teflon® recouvrait l'espace vide entre les bouteilles à scintillation, au niveau du col des bouteilles. Enfin, une plaque de Teflon séparait le tube A et I de chaque gradient. Il est à noter que la concentration en NO_3^- était doublée, par rapport à celle du milieu M, dans les traitements 1, 2, 6 et dans le témoin. La concentration en PO_4^{3-} était doublée dans les traitements 3, 4, 5, 6 et dans le témoin. Ces modifications de concentration ont été

réalisées d'après les analyses nutritionnelles obtenues au chapitre 2 pour la lignée testée, soit la lignée 4C4, afin que les éléments non testés dans les traitements ne soient pas limitant trop rapidement. Les concentrations en NO_3^- ont été ajustées dans les traitements 3 et 4, afin que le ratio entre le KNO_3 et le $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ soit respecté par rapport au milieu M, c'est à dire 60 % de la concentration finale en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, et 40 % en KNO_3 . De la même manière, les concentrations en phosphate étaient ajustées en tenant compte de la contamination du Gel gro en phosphate (Doner and Douds, 1995; Jolicoeur *et al.*, 2002).

L'inoculum utilisé dans ce système était des racines de la lignée 4C4, préalablement mycorhizées par le *G. intraradices* sur milieu M solide, en culture depuis dix semaines. Un bloc de gélose (3 x 2 x 0.5 cm) était inoculé au contact des tubes E et F. Les 21 bioréacteurs ont été placés dans un incubateur, à 26° C dans le noir, pour une durée de six semaines.

Figure 9 : Vue de dessus du système de bioréacteur mettant en évidence l'aspect de gradient. Les racines mycorhizées étaient inoculées à cheval entre les tubes E et F, au contact des milieux contenus dans ces tubes.

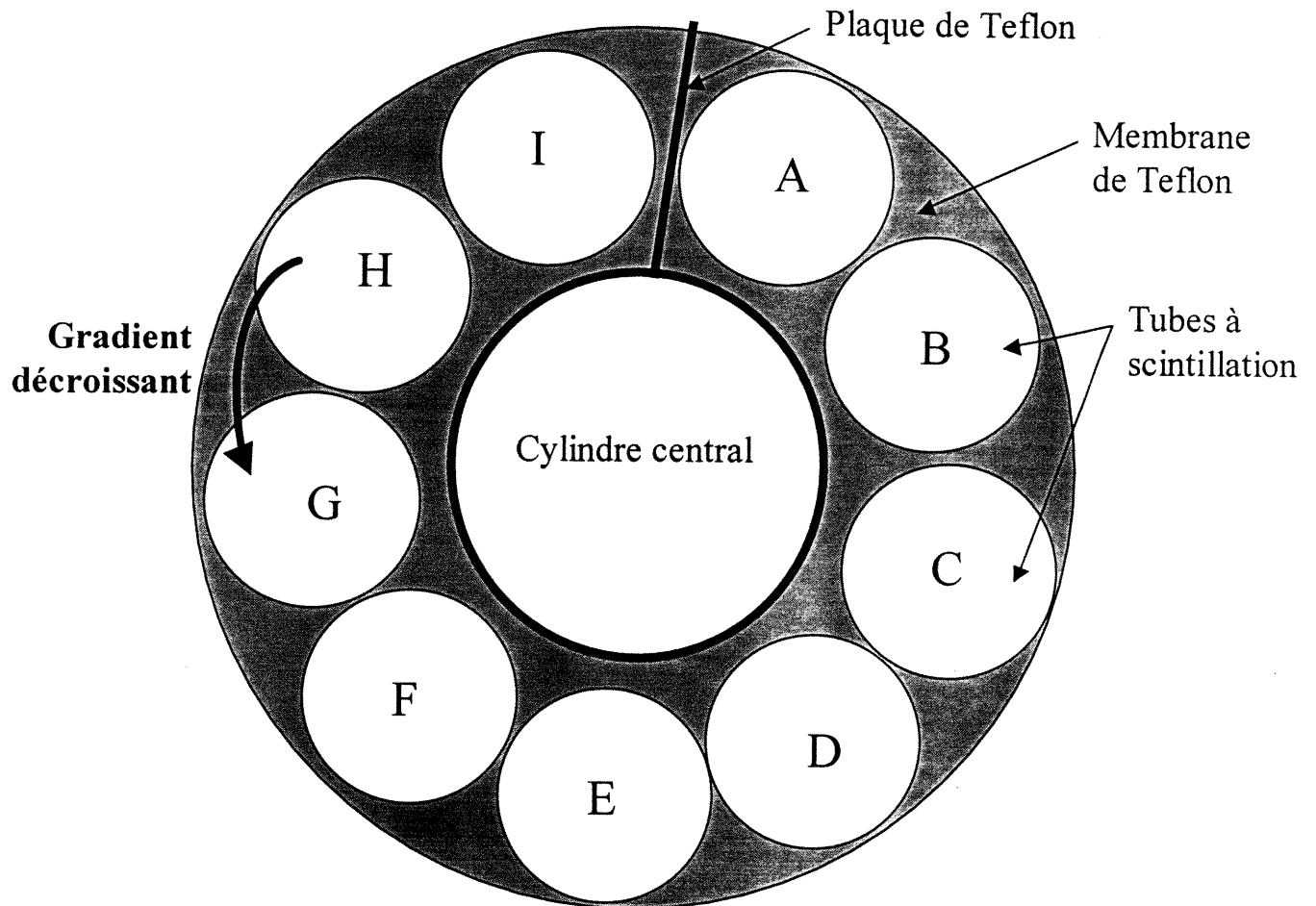


Figure 10: Vue complète du système vide de multi-compartmentation en bioréacteur de type cuvée.



Tableau IV: Composition des milieux de culture dans les six types de bioréacteurs préparés. La concentration indiquée dans chacune des cases correspond à la modification de la concentration de l'élément indiqué à la ligne F (milieu M).

Tubes	Traitements					
	1	2	3	4	5	6
	PO ₄ ³⁻ (mM)	PO ₄ ³⁻ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	NO ₃ ⁻ (mM)	NO ₃ NH ₄ (mM)	Saccharose (mg.L ⁻¹)
A	3	3	50	50	50	250 000
B	3	2,4	50	40	40	200 000
C	1,2	1,8	20	30	30	150 000
D	1,2	1,2	20	20	20	100 000
E	0,12	0,6	2	10	10	50 000
F	0,12	0,12	2	2	2	10 000
G	0,12 (MS *)	0,032 (ML ‡)	2 (MS)	2 (ML)	2 (ML)	5 000
H	0,12 (MS)	0 (MP §)	2 (MS)	2 (MP)	2 (MP)	1 000
I	0 (WGG)	0 (WGG)	0 (WGG)	0 (WGG)	0 (WGG)	0 (WGG)

* MS : milieu M sans saccharose

† WGG : Water Gel Gro rincé (4 g.L⁻¹ de Gel Gro dans de l'eau distillée, puis rincé par du milieu M liquide sans PO₄³⁻)

‡ ML : Milieu M solide rincé (voir chapitre 2) avec du milieu M Liquide

§ MP : Milieu M rincé avec du milieu M liquide sans PO₄³⁻

3.4 Résultats et Discussion

3.4.1 Compartimentation en boîtes de Petri

Le suivi de la croissance et du développement des deux partenaires de la symbiose a été qualitatif au cours de ces expériences. Les résultats les plus probants ont été obtenus avec l'inoculation (b), soit en inoculant des racines entre les compartiments 1 et 3 avec des spores prétraitées au froid (Juge *et al.*, 2002) et inoculées dans le compartiment 1. Sur les 10 boîtes de Petri testées au cours de cette expérience, la symbiose s'est établie dans six boîtes de Petri en quelques semaines. Dès que la symbiose endomycorhizienne était effective entre les racines de carotte et le *Glomus intraradices*, le développement de l'un des deux prenait le dessus sur le développement de l'autre : soit le champignon EVA se propageait intensément (66.6 % des cas), et débordait dans les autres compartiments en peu de temps au cours duquel les racines ne poussaient pas (parfois en moins de 10 jours), soit les racines se développaient dans le compartiment souhaité mais le champignon EVA ne développait pas de mycélium extraradiculaire (33.3 % des cas). Dans les quatre boîtes de Petri où la symbiose ne s'est pas établie, les racines ne se sont pas développées non plus.

Lors des tests d'inoculation (a), les deux partenaires se sont développés mais majoritairement le champignon EVA occupait l'espace au détriment des racines et envahissait rapidement en quelques jours les autres compartiments 2 et 3. Les mêmes phénomènes ont été observés et la colonisation de nouvelles racines par la phase extramatrice du champignon EVA n'a été effective que dans 25 % des cas.

De plus il a été observé que la présence de condensation sur les couvercles des boîtes de Pétris était un facteur qui nuisait à la mise en place de la compartimentation, le champignon EVA s'y développant très facilement. A partir de ces gouttelettes d'eau, le champignon EVA se propageait dans les autres compartiments. Très rapidement deux limitations sont apparues lors de l'utilisation de ce système en boîtes de Petri,

- le faible volume de travail, qui nécessiterait un nombre de réplicats très importants pour palier à la variabilité biologique associée à la faible quantité d'inocula racinaires et fongiques,

- le potentiel invasif très important du *G. intraradices*. Le volume de travail retenu dans les boîtes de Pétris à trois compartiments a été de 7,5 mL par compartiment. Au-delà de ce volume, le champignon EVA envahissait extrêmement rapidement les autres milieux de culture, quelle que soit leur composition. De plus le champignon EVA était aussi capable de croître dans les gouttelettes d'eau de condensation, ce qui faussait aussi les essais de compartimentation.

3.4.2 Compartimentation en bioréacteur de type cuvée

La croissance n'a repris que dans un seul bioréacteur après cinq semaines d'incubation, avec un très faible développement dans un tube contenant le milieu M. Plusieurs facteurs peuvent être en cause dans l'absence de reprise de croissance des racines :

- l'évaporation d'eau des milieux : Après quelques semaines, le niveau des milieux de cultures dans les bouteilles à scintillation avait diminué, formant une

dépression d'environ 2 mL, soit près d'un dixième du volume total de chaque bouteille. Nous avons remis un volume d'eau distillée, équivalent à celui qui s'était évaporé dans toutes les bouteilles, afin de rééquilibrer les concentrations initiales des différents milieux. De plus un Becher contenant 50 mL d'eau distillée a été rajouté au centre du bioréacteur afin de pallier au problème d'humidité de l'air dans le système. Cependant la croissance des racines n'a pas repris.

- La concentration en CO₂ dans les bioréacteurs : la croissance des racines transformées en culture *in vitro* est favorisée par une concentration en CO₂ d'environ 2 % (Jolicoeur *et al.*, 1999). Les racines ont besoin de CO₂ exogène pour réinitier leur croissance même si elles sont capables d'en produire elles-mêmes. De plus le champignon EVA est lui aussi sensible à la concentration en CO₂ (Bécard and Piché, 1989; Bécard *et al.*, 1992). La conception du bioréacteur a été faite de telle sorte que beaucoup d'espaces vides étaient présents. De plus la présence d'un filtre à air sur le couvercle du bioréacteur permettait un échange permanent de gaz avec l'environnement, dont la concentration en CO₂ (0,03 %) n'était pas contrôlée et correspondait donc à celle de l'atmosphère, beaucoup moins riche que celle qui est, par exemple, présente dans les boîtes de Petri scellées, soit 0,5 % à 2 % (Bécard and Piché, 1989).
- L'inoculum : Les racines mycorhizées ont été inoculées sous la forme d'un bloc de gélose dont la taille étaient suffisante pour faire le pont entre deux bouteilles à scintillation. Cependant l'inoculum n'était peut être pas suffisant.

La combinaison de tous ces éléments, à savoir la déshydratation des milieux, la concentration insuffisante en CO₂ ainsi que la taille de l'inoculum, sont des facteurs non négligeables qui n'ont pas permis l'exploitation de ce système expérimental. L'expérience n'a pas été reconduite faute de temps.

3.5 Recommandations

Quelques modifications pourraient être apportées à ce système dans le but de le rendre plus fonctionnel :

- Les cultures pourraient être réalisées dans un incubateur à CO₂ dont la concentration est suivie et maintenue constante dans le temps,
- La diminution de l'espace vide au sein du bioréacteur limiterait les problèmes de déshydratation des milieux de culture.
- L'utilisation de bouteilles à scintillation avec un col plus large permettrait une surface de contact plus importante entre les racines et le champignon avec les milieux de culture. Cela limiterait aussi les espaces morts entre les bouteilles. De plus, les contraintes physiques associées à la conception du système seraient moins importantes pour des racines mycorhizées qui sont habituellement cultivées sur des boîtes de Petri, où la surface de contact avec le milieu est importante.
- La membrane de Teflon® est une membrane inerte, doublée d'une feuille d'aluminium qui donne une certaine rigidité à cette membrane. Il serait intéressant de vérifier l'éventuel relargage d'ions Al³⁺ qui pourraient avoir des

conséquences néfastes sur la physiologie des racines et le fonctionnement de la symbiose (Papernik and Kochian, 1997; Mark and Cassells, 1999; Ma, 2000).

L'exploitation et la validation de ce système permettraient de tester la capacité d'assimilation et de transfert des éléments nutritifs par chacun des deux partenaires, dans un laps de temps à déterminer. Même si aucun résultat probant n'a été obtenu, le potentiel d'utilisation de ce système reste intéressant à développer, car il permettrait entre autres d'explorer l'influence de la concentration du milieu en sucres, phosphate et sources d'azote sur le développement des deux partenaires de la symbiose.

Chapitre 4

Discussion générale

Dans un premier temps, l'efficacité de la transformation bactérienne de cultivars de tomate a permis l'obtention de nombreuses lignées de racines transformées, permettant de choisir celles qui avaient le comportement le plus intéressant en terme de croissance et de réceptivité pour le *Glomus intraradices*. L'utilisation d'un milieu appauvri en phosphate a appuyé le caractère fondamental de ce nutriment pour l'établissement de la symbiose, au-delà de la simple capacité d'assimilation de cet élément par les racines. Les essais de mise au point de systèmes de compartimentation des différentes parties d'une mycorhize ont montré la réelle difficulté d'application d'un tel concept. Finalement l'ensemble de ces travaux soulève des questions concernant la caractérisation et l'utilisation des racines transformées pour l'étude de la symbiose EVA en culture *in vitro*.

4.1 Le métabolisme des racines transformées

Le comportement nutritionnel des lignées de tomate était lié au type de croissance des racines transformées : les racines à croissance rapide consommaient les nutriments plus rapidement que les racines à croissance plus lente. Toutes les lignées étaient donc capables d'assimiler efficacement les éléments minéraux et les sucres du milieu de culture. La réceptivité au *G. intraradices* ne semblait pas être corrélée

directement à l'assimilation des nutriments. Ce premier aspect laissait penser que la sensibilité à la symbiose était plutôt liée au génotype unique de chaque lignée; l'expression de ce génotype ne se reflétait pas dans la dynamique nutritionnelle des racines transformées. La consommation des nutriments par des lignées de même type de croissance (croissance lente ou croissance rapide) était strictement comparable, mais leur sensibilité à la symbiose variait. Cela souligne donc une différence de comportement mais qui n'était pas liée directement à l'assimilation des nutriments, mais plus probablement à leur utilisation intracellulaire (Jolicœur *et al.*, 2002) ou à l'expression de gènes impliqués dans les phases précoces de colonisation (Garcia-Garrido and Ocampo, 2002). A la suite de la réduction de la concentration initiale en phosphate inorganique Pi, passant de 0,118 mM à 0,032 mM dans le milieu de culture, toutes les lignées ont été réceptives à la mycorhization par le *G. intraradices*. La préparation des inocula racinaires et fongiques a été strictement identique pour les expériences sur les deux milieux. Le stress nutritif imposé aux racines en réduisant de plus de 70% la disponibilité initiale en Pi dans le milieu, semble avoir déclenché une modification du métabolisme et de la physiologie des racines, autorisant le développement de la symbiose. Le phosphore est considéré comme l'élément le plus important de la nutrition minérale (Plaxton, 1998). Il intervient dans toutes les voies métaboliques, dont la respiration et la photosynthèse. De nombreux intermédiaires métaboliques sont des esters phosphatés et le pyrophosphate inorganique PPi est un système donneur d'énergie dans le cytosol, dont la concentration est maintenue même en limitation importante de Pi (Theodorou and Plaxton, 1995). La concentration intracellulaire en Pi chez les plantes est 1000 fois supérieure à celle présente dans

l'environnement (Schachtman *et al.*, 1998). La quantité d'énergie dépensée par les plantes pour prélever activement le Pi et maintenir son niveau intracellulaire le plus stable possible démontre l'importance de cet élément. En cas de limitation avancée en phosphate, les plantes développent des stratégies pour acquérir les nutriments (Ryan *et al.*, 2001):

- l'altération de l'architecture racinaire et la ramification accrue pour explorer plus efficacement le sol,
- l'augmentation de la densité et de la longueur des poils absorbants pour augmenter la surface d'absorption,
- la sécrétion de phosphatases pour relâcher le phosphate organique,
- l'exsudation d'acides organiques et de protons pour acidifier la rhizosphère et solubiliser le phosphate inorganique,
- l'établissement de la symbiose endomycorhizienne.

L'expression de ces traits varie selon le génotype de la plante, pas seulement entre les espèces de plantes mais aussi entre les cultivars d'une même espèce. L'exsudation d'acides organiques facilite la chélation de l'Al et du Fe dans le sol. La chélation du Fe et de l'Al permet la restitution de Pi à partir des complexes Al-P et Fe-P (Ryan *et al.*, 2001). En cas de limitation en Pi, il a été montré que le pois chiche, le lupin blanc et la tomate augmentent leur activité PEP carboxylase, une enzyme clef de la biosynthèse du citrate et que ces trois plantes accumulent de l'acide citrique dans leurs racines (Neumann and Romheld, 1999). Cette restitution de Pi semble aussi être facilitée par le relargage de protons, lequel est corrélé à l'exsudation d'acides carboxyliques, mais pas

chez la tomate (Neumann and Romheld, 1999). Les tomates ne relargent pas non plus directement d'acide citrique dans le milieu (Luo *et al.*, 1999). Les mécanismes par lesquels la tomate facilite la restitution du Pi restent à déterminer, mais ne semblent pas être directement liés à l'exsudation d'acides organiques.

La culture *in vitro* de mycorhizes est avant tout un outil qu'il faut caractériser afin de bien le maîtriser, avant de pouvoir l'utiliser pour des études incluant d'autres facteurs, comme d'autres microorganismes, pathogènes ou non. A la lumière de nos résultats, il semble primordial de connaître précisément le comportement nutritionnel des deux partenaires, avant et au cours de la symbiose. Des études ont été réalisées sur la dynamique nutritionnelle de racines transformées de carotte, en symbiose (Jolicoeur *et al.*, 1999, 2002) ou non (Bouchard-Marchand, 2000), mais restent difficilement comparables, de par la variabilité des inocula racinaires et fongiques. A notre connaissance, c'est la première fois qu'a été réalisé un suivi simultané, et sur plusieurs mois de culture, du comportement nutritionnel de plusieurs lignées de racines transformées en relation avec la symbiose endomycorhizienne. Cependant, la capacité de prélever des nutriments et notamment le phosphate dans le milieu ne montre qu'une partie du tableau nutritif des lignées. Il manque l'aspect intracellulaire de la nutrition, à savoir la capacité de stockage et d'utilisation des nutriments par chaque lignée, depuis que les bassins intracellulaires sont considérés comme des éléments clefs pour l'établissement de la symbiose endomycorhizienne *in vitro* (Jolicoeur *et al.*, 2002). Toutes les voies métaboliques sont inter-reliées (Gniazdowska *et al.*, 1999; Farrar *et al.*, 2000) et la régulation de ces voies passe par la phosphorylation d'enzymes clefs, par la

disponibilité d'énergie (ATP, P_{Pi}) et ce, dans des compartiments spécifiques (Schachtman *et al.*, 1998; Raghothama, 2000). Le suivi intracellulaire des concentrations en Pi donnerait donc une indication sur les voies métaboliques concernées. Ces études nécessiteraient l'utilisation de technologies de pointe, comme la RMN (Rasmussen *et al.*, 2000) et l'analyse des gènes impliqués dans les voies métaboliques clefs (Harrison and Dixon, 1994; Harrison, 1999; Burleigh and Harrison, 1997; Burleigh, 2001; Rosewarne *et al.*, 1999).

4.2 Balance hormonale et mycorhization

La physiologie différerait significativement entre les lignées de racines transformées. L'insertion aléatoire du plasmide dans le génome de la plante hôte (Tinland, 1996) a-t-elle une influence significative sur le métabolisme et la physiologie des lignées transformées, notamment face à l'établissement de la symbiose endomycorhizienne? Quelques pistes existent déjà mais il manque encore beaucoup d'informations pour apporter une réponse précise. Certaines protéines codées par le plasmide bactérien sont des enzymes intervenant dans la perception et le métabolisme des hormones végétales. L'ADN-T d'*A. rhizogenes* compte 18 cadres ouverts de lecture, dont quatre semblent essentiels. Le gène *rolA* code pour des facteurs de transcription dont les cibles sont *rolA* lui-même ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'acide gibbérellique; le gène *rolB* code pour une protéine membranaire qui module la perception des auxines; l'expression du gène *rolC* semble intervenir dans plusieurs voies, dont l'activation des cytokinines ainsi que la régulation du transport et

du métabolisme du saccharose. Le rôle de la protéine RolD est moins clair mais cette protéine semble similaire à une ornithine cyclo-désaminase, une enzyme affectant le métabolisme des polyamines (Nilsson and Olsson, 1997; Meyer *et al.*, 2000).

Il devient de plus en plus évident que tous les micro-organismes du sol sont capables de produire des hormones de type végétal. Jusqu'à 80 % des micro-organismes de la rhizosphère produiraient des auxines (Patten and Glick, 1996). Certains auteurs posent même l'hypothèse qu'en conditions naturelles, les plantes ne produiraient pas de cytokinines mais hydrolyseraient celles synthétisées par les symbiotes associés. Cette affirmation se base sur l'absence de cytokinine synthase chez les plantes testées (Holland, 1997). La culture axénique de plantes vient cependant contrebalancer cette hypothèse. En effet, les plantes cultivées en condition stériles sont tout à fait aptes à croître normalement, sans altération visible du développement. Bien sûr, on ne peut pas rejeter non plus l'idée que dans des conditions moins artificielles, les plantes utilisent les hormones synthétisées par leurs symbiotes (Jameson, 2000). Ce peut être une économie d'énergie considérable pour la plante et une voie de communication pour le micro-organisme associé. En 1973, Slankis a proposé la « théorie des auxines », selon laquelle la production de ces hormones par les champignons ectomycorhiziens régulerait la formation ultérieure des mycorhizes (Smith and Read, 1997). De manière comparable, une plante en symbiose avec un champignon EVA accumule *de novo* des cytokinines. Il est cependant encore impossible de préciser si l'accumulation de ces hormones dans les endomycorhizes est d'origine fongique ou bien est induite par la présence du champignon (Barker and Tagu, 2000), sachant que le champignon produirait peut-

être lui aussi des cytokinines. La disparition des réactions de défense par la plante en début de symbiose pourrait être liée à la modification de la balance hormonale induite par le champignon (Barker and Tagu, 2000; Garcia-Garrido and Ocampo, 2002). De plus, la présence intraracinaire d'un organisme modifie significativement la réceptivité ultérieure de la plante face à d'autres organismes, symbiotiques et pathogènes (St-Arnaud *et al.*, 1994, 1997; Pinior *et al.*, 1999; Vierheilig *et al.*, 2000). Toutes ces informations peuvent nous amener à formuler une hypothèse pour expliquer le faible taux de mycorhization des lignées de racines transformées *in vitro* : les racines transformées ont intégré le plasmide d'un autre organisme, l'*A. rhizogenes*, qui synthétise des hormones. La modification de la balance hormonale pourrait diminuer la capacité de colonisation ultérieure par le *G. intraradices*, via un profil d'exsudation racinaire altéré. Mais la réponse à la mycorhization est sûrement plus complexe que cela car les racines excisées non-transformées du cv. Cobra ont eu un comportement similaire à la lignée 4C9, en terme de croissance et de dynamique nutritionnelle, puis en terme de réceptivité au champignon sur milieu de culture réduit en Pi. De plus la modification de la teneur initiale du milieu de culture a favorisé l'établissement de la symbiose pour toutes les lignées testées. La relation entre la disponibilité en phosphate dans le sol et la régulation hormonale des plantes, mycorhizées ou non, n'est pas bien connue. Il a été montré que la symbiose mycorhizienne augmentait le niveau d'auxines intracellulaires des poireaux à des valeurs comparables à celles obtenues chez des poireaux non mycorhizés poussant en milieu riche en phosphate (Torelli *et al.*, 2000). Il a aussi été suggéré que les niveaux en cytokinines augmentaient proportionnellement à la disponibilité en phosphate chez *Plantago major*, mais aussi en fonction du nombre et

de l'activité des apex racinaires (Baas and Kuiper, 1989; Torelli *et al.*, 2000). De plus les concentrations élevées en cytokinines inhibent l'induction de la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans les réactions de défense des plantes, comme les chitinases et les glucanases. L'accumulation des ARN messagers de ces enzymes semble aussi interreliée à la disponibilité en phosphate dans le sol (Lambais and Mehdy, 1998; Shaul *et al.*, 2000). Toutes les informations apportées jusqu'à présent ne sont que des hypothèses ou des preuves indirectes, ne nous permettant pas encore de comprendre l'interrelation entre la balance hormonale, la disponibilité en phosphate dans le sol et l'établissement de la symbiose EVA.

4.3 Le champignon EVA, un symbiote ?

Les champignons EVA sont définis comme des symbiotes mutualistes parce qu'ils améliorent la santé de la plante hôte en échange d'un bénéfice net en carbone. Cependant, plusieurs éléments viennent nuancer cette notion de symbiote mutualiste en ce qui concerne les champignons EVA. Le champignon est biotrophe obligatoire et a besoin d'une source de carbone pour survivre et se propager. La racine exsude constitutivement des molécules dans la rhizosphère et les micro-organismes environnants, pathogènes ou non, perçoivent ces signaux et cherchent à coloniser le système racinaire si tel est leur moyen de propagation et de survie. Les champignons EVA forment un appressorium avant de pénétrer dans la racine. Déjà la plante réagit comme à une agression, une invasion et elle déclenche temporairement la synthèse de molécules de défense, comme les enzymes PAL, CHS, CHI et l'IFR plus des chitinases

et glucanases (Smith and Read, 1997; Blee and Anderson, 2000; Lambais, 2000). L'arrêt des réactions de défense peut être lié à la synthèse d'hormones par le champignon. Les arbuscules, structures les plus confinées à l'intérieur de la racine, ont un cycle de vie d'environ sept jours. Au-delà, les arbuscules dégèrent et meurent. Des expériences d'hybridation *in situ* (Blee and Anderson, 2000) ont révélé que les cellules contenant ces structures expriment fortement les ARNm des enzymes de défense PAL et CHS (Harrison and Dixon, 1993; Blee and Anderson, 1996). La symbiose est apoplastique, la racine empêche le champignon EVA de l'envahir complètement. De plus, nos expériences ont montré que les racines n'établissaient la symbiose qu'en période de stress nutritif important, période où la plante ne dispose plus d'autant d'énergie pour résister à l'invasion.

Conclusion générale

La caractérisation de lignées de racines transformées de tomate en relation avec la symbiose EVA a soulevé plus de questionnements que de réponses. La culture *in vitro* est un outil simple d'utilisation qui nous a permis de nous interroger sur l'implication du phosphate dans l'établissement de la symbiose EVA. Cet élément joue un rôle primordial dans de nombreux processus métaboliques, mais les conséquences de son absence en début de croissance des racines, et non pas sa disparition en cours de croissance, vient remettre en question un certain nombre d'idées reçues et souligner l'importance de pousser les analyses nutritionnelles au niveau intracellulaire. En effet, la majorité des études réalisées sur le phosphate, montrent que les hautes concentrations en phosphate inhibent la symbiose et que la symbiose EVA est favorisée sur des sols moins fertiles. Cependant, la diminution extrême, voire le retrait du phosphate dans les milieux de culture au moment de l'inoculation, pourrait-il permettre la mycorhization de plantes non-mycotrophes, comme *Arabidopsis thaliana* ? Certainement pas de manière aussi simple, mais la nutrition phosphatée reste indéniablement au cœur de la discussion.

Bibliographie générale

- Ames, R. N., Reid, C. P. P. and Ingham, E. R. 1984. Rhizosphere bacterial population responses to root colonization by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* **96**: 555-563.
- Andrade, G., Mihara, K. L., Linderman, R. G. and Bethlenfalvay, G. J. 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant Soil*, **202**: 89-96.
- Ayling, S. M., Smith, S. E., Smith, F. A. and Kolesik, P. 1997. Transport processes at the plant-fungus interface in mycorrhizal associations: physiological studies. *Plant Soil*, **196**: 305-310.
- Baas, R. and Kuiper, D. 1989. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and phosphate on *Plantago major* spp. *pleiosperma* in relation to internal cytokinin concentrations. *Physiol. Plant.* **76**: 211-215.
- Bago, B., Azcón-Aguilar, C. and Piché, Y. 1998. Architecture and developmental dynamics of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. *Mycologia*, **90**: 52-62.
- Bago, B., Pfeffer, P. E., Douds, D. D., Brouillette, J., Bécard, G. and Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* **121**: 263-271.
- Bago, B., Pfeffer, P. E. and Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol.* **124**: 949-957.

- Bagyaraj, D. J., Manjunath, A. and Reddy, D. D. R. 1979. Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhiza with root knot nematodes in tomato. *Plant Soil*, **51**: 397-403.
- Bansal, M. and Mukerji, K. G. 1994. Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora. *Mycorrhiza*, **5**: 39-44.
- Barea, J. M. 2000. Rhizosphere and mycorrhiza of field crops. *In Biological resource management: Connecting Science And Policy. Edited by Balazs, E., Galante, E., Lynch, J. M., Schepers, J. S., Toutant, J. P., Werner, D., Werry, P. A. T.* Springer-Verlag Berlin. pp. 81-92.
- Barker, S. J. and Tagu, D. 2000. The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *J. Plant Growth Regul.* **19**: 144-154.
- Bécard, G., Douds, D. D. and Pfeffer, P. E. 1992. Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *App. Env. Microbiol.* **58**: 821-825.
- Bécard, G. and Fortin, J. A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* **108**: 211-218.
- Bécard, G. and Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *App. Env. Microbiol.* **55**: 2320-2325.
- Bécard, G. and Piché, Y. 1989. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol.* **112**: 77-83.

- Bécard, G. and Piché, Y. 1990. Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. *Can. J. Bot.* **68**: 1260-1264.
- Benhamou, N., Fortin, J. A., Hamel, C., St-Arnaud, M. and Shatilla, A. 1994. Resistance responses of mycorrhizal Ri T-DNA-transformed carrot roots to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. *Phytopathology*, **84**: 958-968.
- Blee, K. A. and Anderson, A. J. 1996. Defense-related transcript accumulation in *Phaseolus vulgaris* L. colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith. *Plant Physiol.* **110**: 675-688.
- Blee, K. A. and Anderson, A. J. 2000. Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. *In* Current Advances In Mycorrhizae Research. *Edited by* Podila, G. K. and Douds, D. D. American Phytopathological Society. St Paul. pp. 27-44.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C. and Barker, D. G. 2001. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for studying nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 693-700.
- Bouchard-Marchand, É. 2000. Études biocinétiques et nutritionnelles de racines transformées de carotte en culture *in vitro*. M. Sc thesis. Department of chemical engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Q.C.
- Brillianceau, M. H., David, C. and Tempé, J. 1989. Genetic transformation of *Catharanthus roseus* G. Don by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Rep.* **8**: 63-66.

- Bryla, D. R. and Koide, R. T. 1998. Mycorrhizal response of two tomato genotypes relates to their ability to acquire and utilize phosphorus. *Ann. Bot.* **82**: 849-857.
- Buée, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. and Bécard, G. 2000. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 693-698.
- Burleigh, S. 2000. Cloning arbuscule-related genes from mycorrhizas. *Plant Soil*, **226**: 287-292.
- Burleigh, S. H. 2001. Relative quantitative RT-PCR to study the expression of plant nutrient transporters in arbuscular mycorrhizas. *Plant Sci.* **160**: 899-904.
- Burleigh, S. H. and Harrison, M. J. 1997. A novel gene whose expression in *Medicago truncatula* roots is suppressed in response to colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi and to phosphate nutrition. *Plant Mol. Biol.* **34**: 199-208.
- Butcher, D. and Street, H. 1964. Excised root culture. *Bot. Rev.* **30**: 513-586.
- Caron, M., Fortin, J. A. and Richard, C. 1985. Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomatoes. *Plant Soil*, **87**: 233-239.
- Chabot, S., Bécard, G. and Piché, Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia*, **84**: 315-321.

- Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F. and Tempé, J. 1982. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of host plant root cells. *Nature*, **295**: 432-434.
- Chriqui, D., Guivarc'h, A., Dewitte, W., Prinsen, E. and Van Onkelen, H. 1996. *Rol* genes and root initiation and development. *Plant Soil*, **187**: 47-55.
- Clark, R. B. and Zeto, S. K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* **23**: 867-902.
- Crowley, D. E. and Rengel, Z. 1999. Biology and chemistry of nutrient availability in the rhizosphere. *In Mineral nutrition of crops: fundamental mechanisms and implications. Edited by Food Products Press, USA. Binghamton.* pp. 1-40.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, É., Asselin, A., Richard, C. and Gianinazzi, S. 1996. Chitinase and beta-1,3-glucanase isoforms expressed in pea roots inoculated with arbuscular mycorrhizal or pathogenic fungi. *Eur. J. Plant Pathol.* **102**: 105-108.
- Dassi, B., Dumas-Gaudot, É. and Gianinazzi, S. 1998. Do Pathogenesis-related (Pr) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **52**: 167-183.
- Declerck, S., Strullu, D. G. and 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, H. W. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, **72**: 1115-1119.

- Diop, T. A., Plenchette, C. and Strullu, D. G. 1994. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. *Symbiosis*, **17**: 217-227.
- Dodd, J. C. 2000. The role of arbuscular mycorrhizal fungi in agro- and natural ecosystems. *Outlook Agr.* **29**: 55-62.
- Doner, L. W. and Douds, D. D. 1995. Purification of commercial gellan to monovalent cation salts in acute modification of solution and gel-forming properties. *Carbohydrate Res.* **273**: 225-233.
- Douds, D. D. and Millner, P. 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agr. Ecosyst. Environ.* **74**: 77-93.
- Douds, D. D. and Nagahashi, G. 2000. Signaling and recognition events prior to colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi. *In Current advances in mycorrhizae research. Edited by Podila, G. K. and Douds, D. D.* American Phytopathological Society. St Paul. pp. 11-18.
- Dumas-Gaudot, É., Slezack, S., Dassi, B., Pozo, M. J., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. 1996. Plant hydrolytic enzymes (chitinases and beta-1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms. *Plant Soil*, **185**: 211-221.
- Escudero, J., Neuhaus, G. and Hohn, B. 1995. Intracellular *Agrobacterium* can transfer DNA to the cell nucleus of the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 230-234.
- Farrar, J., Pollock, C. and Gallagher, J. 2000. Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci.* **154**: 1-11.

- Filion, M., St-Arnaud, M. and Fortin, J. A. 1999. Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytol.* **141**: 525-533.
- Fitter, A. H. and Garbaye, J. 1994. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant Soil*, **159**: 123-132.
- Fortin, J.A., St-Arnaud, M., Hamel, C., Chavarie, C., Jolicoeur, M. 1996. Aseptic *in vitro* endomycorrhizal spore mass production. United States patent, no. 5,554,530.
- Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St Arnaud, M., Coughlan, A. P. and Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Can. J. Bot.* **80**: 1-20.
- Garcia-Garrido, J. M. and Ocampo, J. A. 2002. Regulation of the plant defence responses in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* **53**: 1377-1386.
- Gelvin, S. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 223-256.
- Gerdemann, J. W. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizae. *In* The development and function of roots. *Edited by* Torrey, J. G. and Clarkson, D. T. Academic Press. New York. pp. 575-591.
- Gianinazzi-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M. and Gianinazzi, S. 2000. Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta*, **211**: 609-613.

- Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* **84**: 489-500.
- Giri, A. and Narasu, M. L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnol. Adv.* **18**: 1-22.
- Gniazdowska, A., Krawczak, A., Mikulska, M. and Rychter, A. M. 1999. Low phosphate nutrition alters bean plants ability to assimilate and translocate nitrate. *J. Plant Nutr.* **22**: 551-563.
- Graham, J., Leonard, R. and Menge, J. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant physiol.* **68**: 548-552.
- Grayston, S. J., Vaughan, D. and Jones, D. 1997. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants - The importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *App. Soil Ecol.* **5**: 29-56.
- Guivarc'h, A., Boccara, M., Prouteau, M. and Chriqui, D. 1999. Instability of phenotype and gene expression in long-term culture of carrot hairy root clones. *Plant Cell Rep.* **19**: 43-50.
- Guttenberger, M. 2000. Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta*, **211**: 299-304.
- Hamill, J. and Lidgett, A. 1997. Hairy root cultures- Opportunities and key protocols for studies in metabolic engineering. *In Hairy roots. Culture and applications. Edited by Doran, P. M. Harwood academic publishers.* pp.1-29.

- Hamill, J. D., Parr, J. P., Rhodes, M. J. C., Robins, R. J. and Walton, N. J. 1987. New routes to plant secondary products. *Biotechnology*, **5**: 800-804.
- Harrison, M. J. 1998. Development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Cur. Op. Plant Biol.* **1**: 360-365.
- Harrison, M. J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 361-389.
- Harrison, M. J. and Dixon, R. A. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-microbe Interac.* **6**: 643-654.
- Harrison, M. J. and Dixon, R. A. 1994. Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Plant J.* **6**: 9-20.
- Hildebrand, E. 1934. Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. *J. Agr. Sci.* **48**: 857-885.
- Holland, M. A. 1997. Occam's razor applied to hormonology. *Plant Physiol.* **115**: 865-868.
- Jameson, P. 2000. Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions- An overview. *Plant Gr. Reg.* **32**: 369-380.
- Joao, K. H. L. and Brown, T. A. 1994. Long-term stability of root cultures of tomato transformed with *Agrobacterium rhizogenes* R1601. *J. Exp. Bot.* **45**: 641-647.

- Jolicoeur, M. 1998. Optimisation d'un procédé de production de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs. PhD thesis. Department of chemical engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Q.C.
- Jolicoeur, M., Bouchard-Marchand, É., Bécard, G. and Perrier, M. 2002. Regulation of mycorrhizal symbiosis: Development of a structured nutritional dual model. Ecol. Model. In press.
- Jolicoeur, M., Germette, S., Gaudette, M., Perrier, M. and Bécard, G. 1998. Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi - A symbiotic physiological marker. Plant Physiol. **116**: 1279-1288.
- Jolicoeur, M., Williams, R. D., Chavarie, C., Fortin, J. A. and Archambault, J. 1999. Production of *Glomus intraradices* propagules, an arbuscular mycorrhizal fungus, in an airlift bioreactor. Biotechnol. Bioeng. **63**: 224-232.
- Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A. and Piché, Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. Mycorrhiza, **12**: 37-42.
- Khaliq, A. and Bagyaraj, D. J. 2000. Colonization of arbuscular-mycorrhizal fungi on Ri T-DNA transformed roots in synthetic medium. Indian J. Exp. Biol. **38**: 1147-1151.
- Kormanik, P. P. and McGraw, A. C. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In Methods and principles of mycorrhizal research. Edited by Schenck, N. C. American Phytopathological Society. St Paul. pp. 37-45.

- Lambais, M. R. 2000. Regulation of plant defense-related genes in arbuscular mycorrhizae. *In* Current Advances in Mycorrhizae Research. Edited by Podila, G. K. and Douds, D. D. American Phytopathological Society. St Paul. pp. 45-59.
- Lambais, M. R. and Mehdy, M. C. 1998. Spatial distribution of chitinases and beta-1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal roots under low and high soil phosphate conditions. *New Phytol.* **140**: 33-42.
- Lee, Y., Jin, S., Sim, W. and Nester, E. 1995. Genetic evidence for direct sensing of phenolic compounds by the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 12245-12249.
- Luo, H. M., Watanabe, T., Shinano, T. and Tadano, T. 1999. Comparison of aluminum tolerance and phosphate absorption between rape (*Brassica napus* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in relation to organic acid exudation. *Soil Sci. Plant Nutr.* **45**: 897-907.
- Ma, J. F. 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **41**: 383-390.
- Mark, G. L. and Cassells, A. C. 1999. The effect of dazomet and fosetyl-Aluminium on indigenous and introduced arbuscular mycorrhizal fungi in commercial strawberry production. *Plant Soil.* **209**: 253-261.
- Marschener, H. 1998. Role of root growth, arbuscular mycorrhiza and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. *Field Crops Res.* **56**: 203-207.
- Meyer, A. D., Tempe, J. and Costantino, P. 2000. Hairy root: A molecular overview functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 93-139.

- Morton, J. B. and Benny, G. L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, with two new families, Acaulosporaceae, and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*, **37**: 471-491.
- Mosse, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annu. Rev. Phytopathol.* **11**: 171-196.
- Mosse, B. and Hepper, C. M. 1975. Vesicular-arbuscular infections in root organ cultures. *Physiol. Plant Pathol.* **5**: 215-223.
- Moyano, E., Fornale, S., Palazon, J., Cusido, R. M., Bonfill, M., Morales, C. and Piñol, M. T. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochemistry*, **52**: 1287-1292.
- Mugnier, J. 1997. Mycorrhizal interactions and the effects of fungicides, nematicides and herbicides on hairy root cultures. *In Hairy roots: Culture and applications. Edited by Doran, P. M. Harwood academic publishers.* pp. 123-131.
- Mugnier, J. and Mosse, B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology*, **77**: 1045-1050.
- Nagahashi, G. and Douds, D. D. 2000. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. *Mycol. Res.* **104**: 1453-1464.
- Nagahashi, G., Douds, D. D. and Abney, G. D. 1996. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza*, **6**: 403-408.

- Nauerby, B., Billing, K. and Wyndaele, R. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* **123**: 169-177.
- Neumann, G. and Romheld, V. 1999. Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant Soil*, **211**: 121-130.
- Nicholson, T. 1967. Vesicular-arbuscular mycorrhiza - a universal plant symbiosis. *Sci. Prog. Oxf.* **55**: 561-581.
- Nilsson, O. and Olsson, O. 1997. Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plantarum.* **100**: 463-473.
- Nuutila, A. M., Vestberg, M. and Kauppinen, V. 1995. Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Rep.* **14**: 505-509.
- Olsson, P. A., Bååth, E., Jakobsen, I. and Soderstrom, B. 1996. Soil bacteria respond to presence of roots but not to mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem.* **28**: 463-470.
- Papernik, L. A. and Kochian, L. V. 1997. Possible involvement of Al-induced electrical signals in Al tolerance in wheat. *Plant Physiol.* **115**: 657-667.
- Paszkowski, J., Baur, M., Bogucki, A. and Potrykus, I. 1998. Gene targeting in plants. *EMBO J.* **7**: 4021-4026.

- Patten, C. L. and Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* **42**: 207-220.
- Pinior, A., Wyss, U., Piché, Y. and Vierheilig, H. 1999. Plants colonized by AM fungi regulate further root colonization by AM fungi through altered root exudation. *Can. J. Bot.* **77**: 891-897.
- Piñol, M., Palazon, J., Cusido R. M. and Ribo, M. 1999. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Sci.* **141**: 41-49.
- Plaxton, W. C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *In Phosphorus in plant biology: Regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes. Edited by Lynch, J. P. and Deickman, J. American Society of Plant Physiologist.* pp. 229-241.
- Plenchette, C., Fortin, J. A. and Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil*, **70**: 199-209.
- Porter, J. 1991. Host range and implications of plant infection by *Agrobacterium rhizogenes*. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **10**: 387-421.
- Pozo, M. J., Azcón-Aguilar, C., Dumas-Gaudot, É. and Barea, J. M. 1999. Beta-1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Sci.* **141**: 149-157.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 665-693.

- Raghothama, K. G. 2000. Phosphate transport and signaling. *Cur. Op. Plant Biol.* **3**: 182-187.
- Rasmussen, N., Lloyd, D. C., Ratcliffe, R. G., Hansen, P. E. and Jakobsen, I. 2000. P-31 NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil.* **226**: 245-253.
- Ratnayake, M., Leonard, R. and Menge, J. 1978. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytol.* **81**: 543-552.
- Rayner, M. C. 1927. *Mycorrhiza: An account of non-pathogenic infection by fungi in vascular plants and bryophytes.* Wheldon & Wesley, Ltd., London.
- Redecker, D., Morton, J. B. and Bruns, T. D. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Mol. Phylogen. Evol.* **14**: 276-284.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H. and Kerp, H. 1994. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 11841-11843.
- Rhodes, M. J. C., Robins, R. J., Hamill, J. D., Parr, A. J. and Walton, N. J. 1987. Secondary product formation using *Agrobacterium rhizogenes*-transformed "hairy root" cultures. *TCA Newsl.*, **53**: 2-15.
- Riker, A., Banfield, W., Wright, W., Keitt, G. and Sagen, H. 1930. Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *J. Agr. Res.* **41**: 887-912.

- Robbins, W. J. 1922. Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Bot. Gaz.* **75**: 376-390.
- Rosewarne, G. M., Barker, S. J., Smith, S. E., Smith, F. A. and Schachtman, D. P. 1999. A *Lycopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* **144**: 507-516.
- Rovira, A. D. 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. IV. Influence of plant species, age of plant, light, temperature and calcium nutrition on exudation. *Plant Soil*, **11**: 53-64.
- Ryan, P., Delhaize, E. and Jones, D. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**: 527-560.
- SAS Institute Inc. 1996. *The SAS System for Windows 95, release 6.12*. SAS Institute Inc. Cary, N.C.
- Schachtman, D. P., Reid, R. J. and Ayling, S. M. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol.* **116**: 447-453.
- Schenck, N. C. and Kellam, M. K. 1978. The influence of vesicular arbuscular mycorrhizae on disease development. *Flo. Agr. Exp. Stn. Bull.* **798**: 1-15
- Schreiner, R. P. and Bethlenfalvay, G. J. 1995. Mycorrhizal interactions in sustainable agriculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* **15**: 271-285.

- Schreiner, R. P. and Koide, R. T. 1993. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by mycotrophic and nonmycotrophic plant root systems. *App. Env. Microbiol.* **59**: 2750-2752.
- Schwab, S. M., Leonard, R. T. and Menge, J. A. 1983. Quantitative and qualitative comparison of root exudates of mycorrhizal and nonmycorrhizal plant species. *Can. J. Bot.* **62**: 1227-1231.
- Shaul, O., David, R., Sinvani, G., Ginzberg, I., Ganon, D., Wininger, S., Ben-Dor, B., Badani, H., Ovdar, N. and Kapulnik, Y. 2000. Plant defense responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. *In Current Advances In Mycorrhizae Research. Edited by Podila, G. K. and Douds, D. D.* American Phytopathological Society. St Paul. pp. 61-68.
- Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C. and Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, **363**: 67-69.
- Simoneau, P., Louisy-Louis, N., Plenchette, C. and Strullu, D. G. 1994. Accumulation of new polypeptides in Ri T-DNA-transformed roots of tomato (*Lycopersicon esculentum*) during the development of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *App. Env. Microbiol.* **60**: 1810-1813.
- Slightom, J., Durand-Tardif, M., Jouanin, L. and Tepfer, D. 1986. Nucleotide sequence analysis of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid: identification of open reading frames. *J. Biol. Chem.* **261**: 108-121.
- Smith, S. A. and Read, D. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego.

- Stachel, S. E., Messens, E., Van Montagu, M. and Zambryski, P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, **318**: 624-629.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. and Fortin, J. A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. *Can. J. Plant Pathol.* **16**: 187-194.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Caron, M. and Fortin, J. A. 1995a. Endomycorhizes VA et sensibilité aux maladies: synthèse de la littérature et mécanismes d'interaction potentiels. *In* La symbiose mycorhizienne - État des connaissances. Edited by Fortin, J. A., Charest, C. and Piché, Y. Éditions Orbis. Frelighsburg, Qc. pp. 51-87.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1995b. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysanthemi* in an *in vitro* dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. *Mycorrhiza*, **5**: 431-438.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1996. Enhanced hyphal and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* **100**: 328-332.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vimard, B., Caron, M. and Fortin, J. A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. *Can. J. Bot.* **75**: 998-1005.

- Steinberg, C., Whipps, J. M., Wood, D. A., Fenlon, J., Alabouvette, C. 1999. Effects of nutritional sources on growth of one non-pathogenic strain and four strains of *Fusarium oxysporum* pathogenic on tomato. *Mycol. Res.* **103**: 1210-1216
- Street, H. E. and Lowe, J. S. 1950. The carbohydrate nutrition of tomato roots II. The mechanism of sucrose absorption by excised roots. *Ann. Bot.* **14**: 307-329.
- Subramanian, K. S. and Charest, C. 1999. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. *Mycorrhiza*, **9**: 69-75.
- Subramanian, K. S., Charest, C., Dwyer, L. M. and Hamilton, R. I. 1995. Arbuscular mycorrhizas and water relations in maize under drought stress at tasselling. *New Phytol.* **129**: 643-650.
- Sunilkumar, G., Vijayachandra, K. and Veluthambi, K. 1999. Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing vir gene induction. *Plant Sci.* **141**: 51-58.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*, 2nd ed. Sinauer associates, Inc., Sunderland.
- Tatsumi, J., Yamauchi, A. and Kono, Y. 1989. Fractal analysis of plant root systems. *Ann. Bot.* **64**: 499-503.
- Tawaraya, K., Hashimoto, K. and Wagatsuma, T. 1998. Effect of root exudate fractions from P-deficient and P-sufficient onion plants on root colonisation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza*, **8**: 67-70.

- Tepfer, D. 1984. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. *Cell*, **37**: 959-967.
- Tepfer, D. and Tempé, J. 1981. Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. *C.R. Acad. Sc. Paris*. **292**: 153-156.
- Tester, M., Smith, S. E. and Smith, F. A. 1987. The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Can. J. Bot.* **65**: 419-431.
- Theodorou, M. and Plaxton, W. 1995. Adaptation of plants respiratory metabolism to nutritional phosphate deprivation. *In Environment and plant metabolism: flexibility and acclimatation. Edited by Smirnoff, N. BIOS Scientific Publishers Ltd.* pp. 79-109.
- Tinland, B. 1996. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends Plant Sci.* **1**: 178-184.
- Toivonen, L. 1993. Utilization of hairy roots cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* **9**: 12-20.
- Torelli, A., Trotta, A., Acerbi, L., Arcidiacono, G., Berta, G. and Branca, C. 2000. IAA and ZR content in leek (*Allium porum* L.), as influenced by P nutrition and arbuscular mycorrhizae, in relation to plant development. *Plant Soil*, **226**: 29-35.
- Toussaint, J. P. 2002. Nitrogen transfer and assimilation in a mycorrhizal *in vitro* root culture system. M. Sc thesis. Department of biology, University of Ottawa, Ottawa, O.N.

- Uren, N. C. 2001. Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants. *In* The rhizosphere : biochemistry and organic substances at the soil plant interface. *Edited by* Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. Dekker, M. Editions. New York. pp. 19-40.
- Van Der Heijden, M. G. A., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A. and Sanders, I. R. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, **396**: 69-72.
- Vierheilig, H., Althug, M., Engelstreitwolf, R., Mader, P. and Wiemken, A. 1998. Studies on the attractational effect of root exudates on hyphal growth of an arbuscular mycorrhizal fungus in a soil compartment-membrane system. *Plant Soil*, **203**: 137-144.
- Vierheilig, H., Garcia-Garrido, J. M., Wyss, U. and Piché, Y. 2000. Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 589-595.
- Vierheilig, H. and Piché, Y. 2002. Signalling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. *In* Flavonoids in cell function. *Edited by* Bushlis, B. and Manthey, J. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. pp 23-39.
- Vilaine, F. and Casse-Delbart, F. 1987. Independant induction of transformed roots by the TL and TR regions of the Ri Plasmid of agropine type *Agrobacterium rhizogenes*. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 17-23.
- White, F., Taylor, B., Huffman, G., Gordon, M. and Nester, E. 1985. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *J. Bacteriol.* **164**: 33-44.

- White, F. F., Garfinkel, D. J., Huffman, G. A., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1983. Sequences homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genome of uninfected plants. *Nature*, **301**: 348-350.
- White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**: 3193-3197.
- White, P. R. 1932. Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedlings in liquid media. *Plant Physiol.* **7**: 613-628.
- White, P. R. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant physiol.* **9**: 585-600.
- Zak, B. 1964. Role of mycorrhizae in root disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* **2**: 377-392.