

## LA CULTURE *IN VITRO*: UN OUTIL PRIVILEGIE DE PRODUCTION D'INOCULA DE MYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES

T.A. DIOP\*, M. GUEYE\*, G. BECARD\*\*, Y. PICHE\*\*\* et J.A. FORTIN\*\*\*\*

\*Centre de Recherche ISRA-ORSTOM, B.P. 1386 Dakar Sénégal

\*\*U.S.D.A. Philadelphia, Pennsylvania 199118 USA

\*\*\*C.R.B.F. - Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

\*\*\*\*University of Montréal, Québec, Canada

*Résumé: La culture d'un champignon endomycorhizien à vésicules et arbuscules, Gigaspora margarita en association avec des racines transformés de carotte, en conditions axéniques et sur un même milieu, a permis d'obtenir un inoculum de qualité selon un modèle simple et reproductible. Ce système de culture permet de produire massivement des hyphes mycéliens, de nombreuses unités d'infection, des spores matures et viables. Ce modèle axénique a permis aussi de calculer d'une manière originale le degré de colonisation racinaire en relation avec les autres paramètres de la mycorrhization étudiés. Les racines génétiquement transformés par le plasmide Ri T-DNA d'Agrobacterium rhizogenes méritent donc d'être prises en considération dans les techniques de production d'endomycorhizes.*

*Abstract: Culturing Gigaspora margarita, a VA endomycorrhizal fungus in association with transformed carrot roots, under axenic conditions, in a single medium, produces good quality inoculum; the model is simple and can be reproduced. This culture system allows for massive production of mycelium hypha, large numbers of infection units, and mature, viable spores. This axenic model can also be used to make a most original calculation of the degree of root colonization in relation to other mycorrhizal parameters being studied. The use of roots genetically transformed by the Ri T-ADN plasmide of Agrobacterium rhizogenes is worth bearing in mind when developing techniques for the production of endomycorrhiza.*

Les mycorhizes à vésicules et arbuscules (MVA) constituent une association symbiotique entre les champignons obligatoires et les racines de la grande majorité des plantes d'importance économique considérable. Cette association se rencontre dans des sites écologiques très contrastés allant des arctiques aux tropiques (Gerdeman 1968, Mosse 1973). Le rôle bénéfique des MVA dans la nutrition phosphatée de la plante-hôte ainsi que dans d'autres aspects de la nutrition minérale, de la protection contre le potentiel infectieux du sol, de l'absorption en eau et de l'interaction positive avec les bactéries fixatrices d'azote a été largement démontré (Azcon-Aguillar and Barea 1981, Nelson and Safir 1982, Francis *et al.* 1986).

Actuellement les connaissances écophysiologiques acquises permettent d'envisager l'utilisation à grande échelle des mycorhizes endotrophes. De nombreuses techniques culturales (en pots, aux champs, en serres, en hydroponie, en aéroponie, en conditions axéniques...) tenant compte du caractère de symbiote obligatoire, sont utilisées pour produire massivement de l'inoculum MVA.

Ce présent article décrit l'utilisation de la culture *in vitro* pour produire dans des boîtes de Pétri contenant un milieu minéral solide, de l'inoculum d'un champignon mycorhizien à vésicules et arbuscules associé à des racines génétiquement transformées de carotte.

## MATERIEL ET METHODES

### *Production, extraction et purification de l'inoculum*

*Gigaspora margarita* Becker et Hall, identifié sous le numéro DAOM 194757, et déposé au Centre de Recherche en Biosystématique d'Ottawa au Canada a été utilisé comme symbiote fongique pour la production d'inoculum. Les spores de *G. margarita* ont été produites de façon massive au bout de six mois en conditions de serre en association avec le poireau (*Allium porum*) dans le Turface (montmorillonite calcinée). Ce support physique est produit par International Minerals and Chemical Corporation, Industrial Minerals Division, 421 East Hawley Street, Mundelein, Illinois 60060, USA, et vendu à Québec par le Groupe vert, 76, de la Pointe-aux-Lièvres Sud, Québec. Après six mois de croissance, le poireau a été enlevé et le Turface a été lavé sous un filet d'eau à travers trois tamis superposés ayant respectivement 500, 250 et 106  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les agrégats déposés sur les tamis 250 et 106  $\mu\text{m}$  sont récupérés et centrifugés selon un gradient de densité constitué d'une solution de Rénographine-60 à quatre concentrations (10%, 20%, 40% et 60%) à une vitesse de 1800 tours/min. Les spores de *Gigaspora margarita* blanches, jaunes, ou oranges présentes aux interfaces, sont recueillies et mises en germination dans des boîtes de Pétri (100 x 15 mm) contenant du milieu minimal M de White solidifié à 0.4% avec la gélose Gel gro. Les spores viables germaient entre trois et six jours dans un incubateur à 27°C.

### *Culture de racines isolées*

Les racines de carotte, génétiquement transformées par le plasmide Ri T-DNA d'*Agrobacterium rhizogenes* selon la méthode de Bécard et Fortin (1988) sont cultivées dans le milieu M de White. Ce matériel racinaire cultivé *in vitro* est une source de matériel végétal inépuisable pour des études aseptiques de mycorhization et sans apport exogène de régulateurs de croissance.

### *Inoculation des racines isolées*

L'unité expérimentale consistait en une culture d'un segment racinaire (mesurant 7 cm, âgé de 17 j et pesant environ 0,05 g) non inoculé de façon dirigée par trois spores prégermées de *G. margarita* dans une boîte de Pétri carrée (9 x 9 cm) contenant 40 ml de milieu M solidifié à 0,4% de Gel gro (Fig. 1). Les boîtes de Pétri étaient placées verticalement à l'obscurité dans un incubateur à 27°C. Deux bandes de coton (Cotons absorbants, Helthco DD1, Montréal, Québec) stériles placées en bas de chaque boîte de Pétri absorbaient les condensations d'eau dues à cette position.

### *Evaluation de l'endomycorhization*

L'établissement de la symbiose endomycorhizienne était évalué périodiquement pendant 12 mois par des observations et mensurations sur les paramètres suivants: poids frais racinaire, densité du mycélium extramatriciel, nombre de spores matures produites, nombre et longueur

d'unités d'infection, degré de colonisation racinaire, viabilité des spores matures néoformées. La présence du champignon était observée après un éclaircissement des racines au KOH 10%, rinçage à l'eau distillée et coloration au noir de Chlorazol E selon la méthode de Brundrett *et al.* (1984). Les racines colorées ont été écrasées délicatement entre lames et lamelles et observées dans le glycérol au microscope photonique de type Zeiss.

Le pourcentage ou degré de colonisation racinaire a été évalué après coloration racinaire suivant deux méthodes différentes. La première méthode de calcul était celle décrite par Furlan et Fortin (1973). Des segments racinaires (1,5 à 2 cm) placés à intervalles réguliers entre lames et lamelles sont observés au grossissement 16 X. Dans le champ optique du microscope, le segment renfermant des hyphes indépendamment du stade ou de l'intensité de la mycorhization était comptabilisé. Le rapport entre le nombre de points colonisés et le nombre total de points observés représente le degré de colonisation racinaire. La deuxième méthode est une méthode directe de calcul du degré de colonisation racinaire. Elle est obtenue par un rapport entre la longueur totale des unités d'infection et la longueur de l'ensemble du système racinaire. Une unité d'infection est constituée d'un segment racinaire massivement envahi par les arbuscules intracellulaires. Dans nos conditions, la croissance moyenne des racines transformées atteignait en moyenne 23 m de long après deux à quatre mois de culture, juste avant la perturbation des corrélations trophiques.

Le comptage de spores matures a été effectué facilement sous la loupe binoculaire à cause de la transparence de la gélose Gel gro. La viabilité des spores matures néoformées *in vitro* a été testée selon quatre procédés de mise en germination durant une période de 10 jours, sur un milieu minimal M de White gélosé. Ces essais de germination se faisaient suivant les conditions suivantes: germination directe des spores produites en milieu fermé, germination des spores en association avec des racines isolées, germination directe des spores ayant subi des stérilisations de surface selon la méthode de Mertz *et al.* (1979), germination des spores ayant préalablement séjourné au froid pendant une semaine.

### *Analyse statistique*

Toutes les expériences ont été effectuées dans un incubateur suivant un dispositif complètement aléatoire. Une boîte de Pétri (9 x 9 cm) contenant un segment de racine de carotte transformée inoculée ou non constituait une unité expérimentale. Tous les deux mois de culture, le poids frais des racines, le nombre de spores matures néoformées, le pourcentage de colonisation estimé selon la méthode de Furlan et Fortin (1973), ont été obtenus à partir de valeurs moyennes de 10 répétitions par traitement pendant les six premiers mois et de trois répétitions par traitement à la récolte finale du douzième mois. Les autres paramètres (pourcentage de colonisation racinaire calculé selon la méthode directe, nombre et longueur d'unités d'infection mycorhizienne) ont été déterminés dans trois boîtes de Pétri inoculées à chaque période de récolte durant toute l'expérience.

Le test statistique de comparaisons multiples de Waller Duncan ( $P < 0.05$ ) a permis d'analyser les paramètres moyens étudiés. Les données du poids frais et de la croissance racinaire ont été interprétées par période de récolte et les autres variables, en fonction du temps. L'homogénéité de la variance a été vérifiée par le test de Bartlett (Anderson and McLean

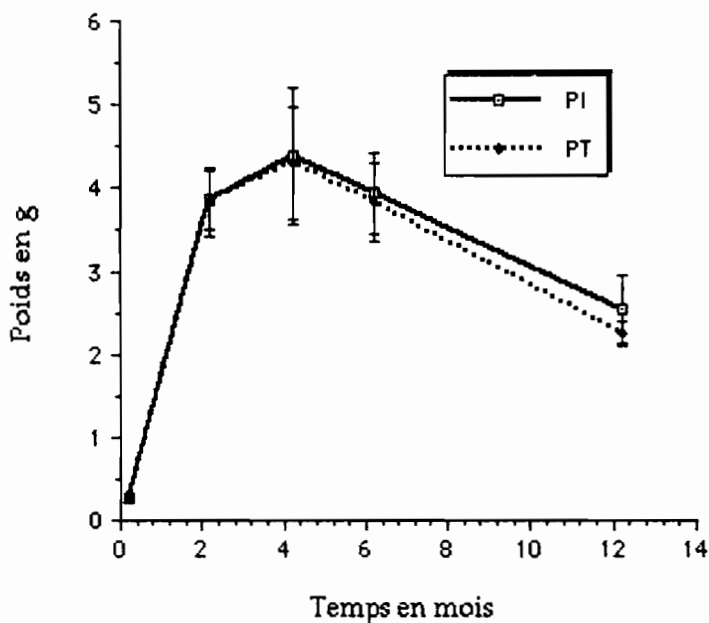
1974). Une transformation logarithmique des données du pourcentage de mycorhization calculé selon la méthode directe et une autre transformation racine carrée sur les spores matures produites ont été nécessaires pour obtenir une distribution normale. A la fin de l'expérience des corrélations linéaires (coefficients de Pearson au seuil de probabilité 0.05) ont été établies entre toutes les variables suivies durant un an de culture. La viabilité des spores produites était le pourcentage de germination de 15 spores testées par traitement sur une période de culture de 10 jours.

## RESULTATS

### *Poids frais des racines transformées inoculées et non inoculées*

Le poids frais des racines transformées inoculées a été identique à celui des racines transformées non inoculées (Fig. 1). Le poids frais des racines a augmenté rapidement durant les deux premiers mois de culture, jusqu'à une valeur maximale au quatrième mois et a diminué progressivement jusqu'au douzième mois. Le poids frais des racines a été aussi négativement corrélée à tous les autres paramètres mycorhiziens (Tableau 3).

Figure 1. Evolution du poids frais des racines en boîtes de Pétri inoculées (PI) et non inoculées (PT). Les barres verticales représentent l'écart type de la moyenne.



### *Propagation in vitro du symbiote fongique*

Nos conditions axéniques de culture ont permis un développement très rapide des structures macroscopiques du champignon *G. margarita*. Une semaine après l'inoculation, les hyphes mycéliens de *G. margarita* avaient une morphologie ondulatoire et pouvaient entrer en contact avec les racines isolées ou croître le long de celles-ci.

Après deux mois d'incubation, le mycélium était très dense et couvrait toutes les boîtes de Pétri. Cette propagation active du *G. margarita* a été aussi ponctuée de multiples cellules auxiliaires ornementées typiques de l'espèce qui se formaient en surface par grappes.

La sporulation *in vitro* du *G. margarita* en présence des racines transformées de carotte était effective vers le deuxième mois de culture. Les spores matures néoformées avaient une forme régulière, elles étaient globuleuses et blanchâtres.

Elles apparaissaient isolément en surface dans les boîtes de Pétri et ne semblaient pas avoir de zones préférentielles de formation. Elles pouvaient apparaître à l'intérieur des racines, loin de celles-ci ou dans les bordures de pastilles d'inoculation. Par contre les spores d'origine devenaient de plus en plus brunâtres avec le temps.

En moyenne on enregistrait trois spores matures produites au deuxième mois et un rendement de plus de 400 spores par boîte de Pétri à la fin de l'expérience. A partir du quatrième mois de culture toutes les boîtes de Pétri observées englobaient des nouvelles spores avec un taux de présence allant de 15 à 39 propagules du champignon endomycorhizien.

Cette sporulation variable dans le temps se réalisait suivant deux grandes périodes: la première était lente pendant toute la phase active de développement des racines isolées et la deuxième était rapide avec une perte accentuée du poids frais de ces mêmes racines (Fig. 2). La production axénique de nouvelles spores matures était corrélée positivement à 89% et à 92% respectivement à la longueur et au nombre d'unités d'infection (Tableau 3).

L'influence de l'inoculation en milieu fermé stérile était aussi visible par l'observation de structures microscopiques typiques du *G. margarita* dans les cellules intraracinaires. Les segments de racines colorées pouvaient présenter en même temps divers stades de colonisation.

Les unités d'infection ou segments racinaires massivement envahis par le symbiote fongique s'établissaient de manière variable dans le temps par une augmentation en nombre et en longueur. Entre le deuxième et le douzième mois de culture, le nombre moyen d'unités d'infection passait de 71 à 479 et mesurait respectivement 1,75 et 5,10 mm.

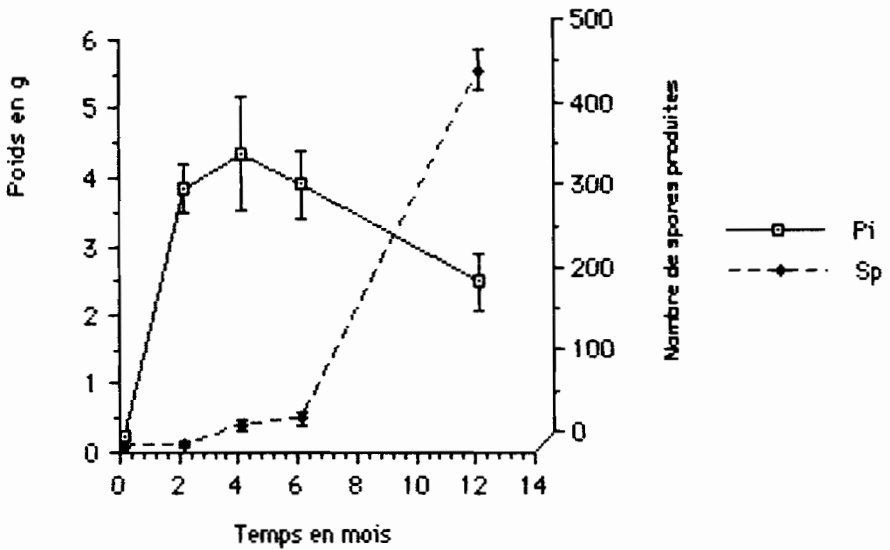
L'évolution de ces derniers paramètres suivait la même allure dans le temps (Fig. 3). En observant les unités d'infection, on était aussi frappé par le nombre élevé des points d'adhérences du *G. margarita* sur les racines isolées.

**Viabilité des spores néoformées en conditions in vitro**

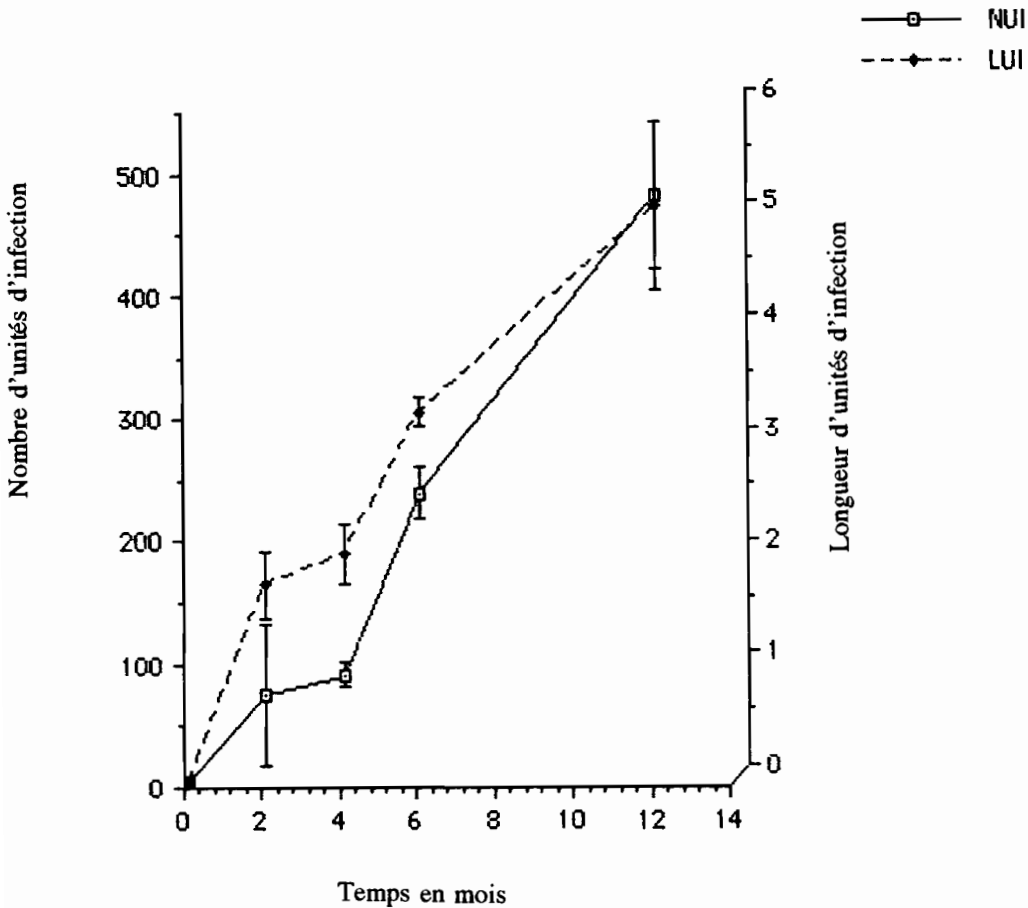
Le champignon *G. margarita* en association avec les racines génétiquement transformées de carotte a produit de nouvelles spores matures et viables (Tableau 1). Les tests de germination réalisés pour constater cette viabilité ont montré des taux différents. Quarante pour cent des spores ont germé directement sur milieu M gélosé sans la présence de racines ou aucun traitement préalable.

En présence de l'hôte végétal ou après une stérilisation superficielle des spores le taux de germination était de 26,70%. Le séjour au froid d'une semaine des spores avant leur incubation à 27°C a induit un taux de germination de 33,33% au terme des 10 jours d'expérimentation.

**Figure 2. Evolution du nombre de spores matures néoformées (Sp) et du poids frais des racines inoculées (Pi) en milieu fermé**



**Figure 3. Evolution du nombre et de la longueur des unités d'infection en boîtes de Pétri.**  
 Nombre moyen d'unités d'infection (NUI), Longueur moyenne d'unités d'infection.  
 Chaque point représente la valeur moyenne de trois répétitions.



### *Degré de colonisation racinaire*

Les deux méthodes d'évaluation du taux de colonisation racinaire ont donné des résultats très distincts: a) la méthode Furlan et Fortin (1973) a montré que pendant les quatre premiers mois de culture, les racines transformées de carotte étaient faiblement colonisées par le symbiote fongique. Le degré de colonisation était inférieur à 20%. La présence du champignon était plus importante à partir du sixième mois avec un taux de présence de *G. margarita* estimé à 89,80% au sixième mois et 93,57% en fin d'expérience. b) le degré de colonisation racinaire estimé par la méthode directe de calcul durant les deux et quatre premiers mois était en dessous de 1%, puis était approximativement égal à 3,35 au sixième

mois de culture et à 10,57% après douze mois, ce qui signifiait aussi qu'avec une production fixe de 23 m de racines, seulement un peu plus de 2,43 m ont été réellement colonisés par les arbuscules ou structures fongiques intraracinaires après un an de vie symbiotique. Mais ce pourcentage calculé correspondait en fin d'expérience à près de 500 unités d'infection avec un nombre important de points de pénétration du *G. margarita*.

Les deux méthodes d'estimation du pourcentage de colonisation racinaire étaient aussi corrélées de façon différente à tous les autres paramètres mycorhiziens (Tableau 3). Le pourcentage de mycorhization obtenu selon la méthode directe de calcul a été très positivement corrélé à toutes les autres variables. A titre comparatif et sous nos conditions expérimentales, le pourcentage de colonisation racinaire calculé à partir de cette dernière méthode pouvait expliquer jusqu'à 95% la sporulation et à 97% la présence du nombre d'unités d'infection.

D'autre part, le pourcentage de mycorhization estimé selon la méthode Furlan et Fortin (1973) se liait avec ces mêmes variables selon les taux respectifs de 47 et 84%. On remarquait aussi que les unités mycorhiziennes d'infection étaient positivement corrélées ( $r > 0,80$ ) aux différentes méthodes d'évaluation de la colonisation racinaire.

**Tableau 1. Pourcentage de germination des spores néoformées de *G. margarita* en présence des racines transformées de carotte**

Matériel	% de germination
spores isolées	40,0
spores + racines	26,70
spores isolées après stérilisation	26,70
spores isolées après choc thermique*	33,33

\* Le choc thermique consiste à faire séjourner les spores à 4°C pendant une semaine avant leur incubation à 27°C.

**Tableau 2. Pourcentage de colonisation racinaire évaluée par deux méthodes différentes sur une période de 12 mois de culture**

Période de culture	Première méthode	Deuxième méthode
2 mois	14,90 d	0,54 c
4 mois	16,25 c	0,77 c
6 mois	89,80 b	3,35 b
12 mois	93,57 a	10,57 a

Dans les colonnes les valeurs non suivies par la même lettre sont significativement différentes au seuil de probabilité 5% (Test de Waller-Duncan).



## DISCUSSION

Nos conditions axéniques de coculture du *G. margarita* avec des racines transformées de carotte ont permis l'obtention d'une importante biomasse racinaire, d'une dissémination active du champignon avec des infections typiques et de nombreuses spores néoformées et viables. L'évolution du poids frais des racines transformées de carotte inoculées avec *G. margarita* et non inoculées était sensiblement identique pendant toute l'expérience. En effet, les cellules des tissus racinaires transformées de carotte comme celle d'une tumeur végétale sont douées naturellement d'un potentiel énorme de croissance sans apport hormonal (Tepfer 1984, Nester et al. 1982). De plus ces racines isolées bénéficiaient dans le milieu M gélosé des facteurs physico-chimiques favorables à leur développement. Dans ce milieu de culture, les concentrations critiques de carbone, d'azote et de phosphore ont été calculées suite à des études comparatives avec le milieu d'origine de White. La grande stabilité thermique de la gélose Gel gro contribuait aussi efficacement à l'établissement d'un système racinaire sain et moins nécrosé, ce qui confère à ces racines une indépendance fonctionnelle vis à vis de la colonisation progressive du champignon endomycorhizien.

Tableau 3. Corrélation linéaire entre les différentes variables mesurées

	% est.	Spores	Long UI	Nomb. UI	% calc.	PFR
% est.	1 000	0,476	0,857	0,825	0,772	-0,336
Spores		1 000	0,899	0,921	0,956	-0,579
Long. UI			1 000	0,949	0,969	-0,759
Nom. UI				1 000	0,977	-0,766
% calc.					1 000	-0,807
PFR						1 000

Pourcentage de mycorhization calculé (% calc.); Pourcentage de mycorhization estimé (% est.); Longueur d'Unité d'infection (Long. UI); Nombre d'Unités d'infection (Nomb. UI); Poids Frais des Racines (PFR). NB: Les coefficients  $r$  de Pearson sont significatifs au seuil de probabilité 0.05.

La présence d'un important réseau mycélien extramatriciel dans les boîtes de Pétri contenant des racines inoculées était conforme avec les mesures calculées de la croissance hyphale de *G. margarita* (Bécard et Piché 1989a). D'autre part, la prolifération de cellules auxiliaires typiques du champignon à la surface de la gélose avait déjà été mentionnée par Pons et Gianinazzi-Pearson (1985) lors d'observation *in vitro* de la phase extramatricielle du *G. margarita*.

La production de nouvelles spores matures en conditions aseptiques débute vers le deuxième mois de culture. Ces spores produites *in vitro* avaient des tailles plus homogènes comparativement à celles des propagules habituellement récoltées en conditions de serres. L'évaluation de trois nouvelles spores produites après deux mois, rejoignait les résultats des seules études aseptiques faites antérieurement sur *G. margarita* en association avec les racines

de tomate par Miller-Wideman et Watrub (1984) qui avaient utilisé dix spores prégermées du *G. margarita* comme inoculant potentiel.

Nos résultats obtenus dans des conditions axéniques, confirmaient que l'infectivité endomycorhizienne dépend de la viabilité et de la physiologie des spores. La multiplication des spores du *G. margarita* sous nos conditions de culture, était accélérée à partir de six mois pour atteindre un rendement de 449 spores. La formation de ces nouvelles propagules, exigeait au préalable la prolifération d'une grande biomasse végétative matérialisée par un réseau extramatriciel très dense et par l'importance en longueur et en nombre des unités d'infection intraracinaires. Cette sporulation accélérée coïncidait aussi avec une chute aussi accélérée du poids frais des racines et un ralentissement de la croissance racinaire. La forte corrélation négative entre ces deux variables ( $r=-0,58$ ) signifiait leur développement asynchrone. Certains chercheurs (Hall 1976, Tommerup and Abott 1981) ont rapporté la viabilité des hyphes endomycorhiziens dans les racines sénescentes ou mortes. Nos résultats ont confirmé l'existence d'une vie symbiotique active en conditions *in vitro* après un an de culture. Le brunissement des spores "mères d'origine" révélait que ces derniers utilisaient activement leurs réserves lipidiques au cours du temps.

L'observation microscopique des racines transformées de carotte après coloration, montrait que le processus d'infection n'était pas synchronisé au niveau tissulaire. Les différentes étapes de ce phénomène (formation d'appressorium, pénétration intercellulaire ou intracellulaire) pouvaient être visualisées dans le même segment racinaire. L'établissement mycorhizien en conditions aseptiques se manifestait par la présence d'unités d'infection. Ces sites d'échanges nutritionnels préférentiels entre les deux partenaires symbiotiques devenaient importantes avec le temps. Les données relatives aux unités d'infection expliquaient amplement le processus de colonisation racinaire qui se réalisait de deux façons synchronisées dans le temps: par une augmentation du nombre d'unités d'infection et par leur accroissement en longueur.

L'évaluation de l'effet des symbioses mycorhiziennes est basée sur la quantification de paramètres relatifs au macrosymbiote végétal (incidence sur la biomasse et la croissance des systèmes racinaires, éléments nutritifs, vigueur...) et ceux liés au microsymbiote fongique (importance de la phase extramatricielle, nombre de points d'infection, activité reproductrice, pourcentage de colonisation racinaire...). Le degré de colonisation racinaire reste le paramètre le plus employé. Récemment, Giovannetti et Mosse (1980) ont discuté des différentes techniques d'évaluation des racines mycorhizées. Toutes les méthodes se révèlent subjectives donc pouvant induire des surestimations erronées. La méthode de quantification des chitines semble appropriée pour les cultures sur milieux synthétiques stériles pour empêcher la mesure de parasites racinaires renfermant la substance. Une des contraintes à son utilisation réside en la nécessité absolue d'utilisation d'une technologie complexe et destructive pour aboutir à cette fin.

Les deux méthodes de calcul de pourcentage de mycorhization évaluées durant l'expérience ont montré des résultats très différents. La première explication à ces faits, serait liée à leur façon spécifique d'évaluation. Notre méthode directe de calcul (2ème méthode), contrairement à celle de Furlan et Fortin (1973) (1ère méthode), était étroitement corrélée à la formation des spores, des unités d'infection et au développement des racines isolées. Cette

méthode direct axée sur le stade ultime de la mycorhization, caractérisait fortement l'activité métabolique du *G. margarita* en association avec les racines isolées. Ainsi, un pourcentage de colonisation racinaire inférieur à 1% calculé avec cette dernière méthode directe, était suffisant pour l'établissement d'une importante biomasse hyphale et pour déclencher la sporulation du *G. margarita*.

Les spores des champignons mycorhiziens à vésicules et arbuscules peuvent présenter de bonnes caractéristiques morphologiques et être non viables (Miller-Wideman and Watrub 1984, Mugnier and Mosse 1987). Ceci confirme la nécessité de vérifier leur viabilité avant une utilisation à des fins pratiques ou fondamentales. Les nouvelles spores produites dans nos conditions germaient selon quatre procédés de culture. Elles présentaient un meilleur taux de germination (40%), quand elles étaient délicatement transférées dans un autre milieu gélosé M neuf. Ce résultat est en désaccord avec les tests de Miller-Wideman et Watrub (1984) qui mentionnaient la présence absolue de l'hôte végétal pour déclencher la germination de ces spores. Les exsudations racinaires, la stérilisation de surface et les chocs thermiques avaient aussi une influence sur la germination des spores sous nos conditions de culture. Il serait intéressant de comparer le pouvoir germinatif de ces quatre procédés à plus long terme. Des microorganismes non pathogènes pourraient aussi être testés dans la germination de ces spores nouvellement produites (Mosse 1962, Mugnier and Mosse 1987).

La culture mixte *in vitro* de *G. margarita* et des racines isolées est un excellent outil pour comprendre l'évolution de cette association symbiotique. Nos résultats ont montré que *G. margarita* produisait en conditions axéniques de nouvelles spores matures et viables. Cependant, cette capacité de sporulation, n'était seulement possible qu'après l'établissement et le développement de structures extra et intramycéliennes, suivis d'une réduction des activités métaboliques du partenaire végétal. La méthode directe de calcul du pourcentage de colonisation racinaire, est très prometteuse pour évaluer la mycorhization en milieu fermé. D'autre part la possibilité de cultiver en boîtes de Pétri d'autres champignons endomycorhiziens en association avec les racines transformées (Chabot 1990) garantit la diversité des sources d'inocula. Nos travaux ont aussi décrit pour la première fois la productivité à long terme d'une association mycorhizienne dans un même milieu de culture. Des expériences sont en cours pour réduire la période active de sporulation afin de réussir une production axénique d'inoculum à plus grande échelle.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anderson V.L. and Mclean R.A. (1974). *Design of experiments. A realistic approach*. Marcel Dekker Inc., Ed. New York. 418 pp.
- Azcon-Aguillar C. and Barea J.M. (1981). Field inoculation of *Medicago* with VA mycorrhiza and *Rhizobium* phosphate-fixing agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* 13: 19-22.
- Bécard G. and Fortin J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-TDNA transformed roots. *New Phytologist* 108: 211-218.
- Bécard G. and Piché Y. (1989a). New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* 112: 77-83.

- Brundrett M.C., Piché Y. and Peterson R.L. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular arbuscular mycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 62: 2128-2134.
- Chabot S. (1990). Système axénique de culture en duo comme modèle pour l'étude des endomycorhizes à vésicules et arbuscules. Mémoire M. Sc. Université Laval.
- Francis R., Finlay R.D. and Read D.J. (1986). Vesicular-arbuscular in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter and intra-specific combinations of host plants. *New Phytologist* 102: 103-111.
- Furlan V. and Fortin J.A. (1973). Formation of endomycorrhizae by *Endogone calospora* on *Allium cepa* under three temperature regimes. *Nat. Can.* 100: 467-477.
- Gerdeman J.W. (1968). Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual Review of Phytopathology* 6: 397-418.
- Giovanetti M. and Mosse B. (1980). An evaluation for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist* 84: 489-500.
- Hall I.R. (1976). Response to *Coprosoma robusta* to different forms of endomycorrhizal inoculum. *Transactions of the British Mycological Society* 67: 409-411.
- Mertz S.M., Heitatus III J.J. and Bush R.L. (1979). Mass production of axenic spores of the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Transactions of the British Mycological Society* 72: 167-169.
- Millar-Wideman M.A. and Watrud L.S. (1984). Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. *Canadian Journal of Botany* 30: 642-646.
- Mosse B. (1976). The role of mycorrhiza in legume nutrition on marginal soils. In: Proc. NIFTAL Workshop. Exploiting the legume Rhizobium in tropical agriculture. *Hawaii Coll. Trop. Agric. Misc. Publ.* 145: 275-292.
- Mosse B. (1962). The establishment of vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *Journal General of Microbiology* 27: 509-520.
- Mosse B. (1973). Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. *Annual Review of Phytopathology* 11: 171-196.
- Mugnier J. and Mosse B. (1987). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. *Phytopathology* 77: 1045-1050.
- Nelson C.E. and Safir G.R. (1982). Increased drought tolerance of mycorrhizal onion plants caused by improved phosphorus nutrition. *Planta*. 154: 437-443.
- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M. and Yanofsky M.F. (1984). Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Reviews of Plant Physiology* 35: 387-413.
- Pons F. and Gianinazzi-Pearson V. (1984). Observations on extra-matrical vesicles of *Gigaspora margarita* *in vitro*. *Transactions of the British Mycological Society* 84(1): 168-170.
- Pons F. et Gianinazzi-Pearson V. (1985). Influence du phosphore, du potassium, de l'azote et du pH sur le comportement *in vitro* de champignons endomycorhizogènes à vésicules et arbuscules. *Cryptogamie mycologie*. Tome 5: 87-100.
- 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.
- Tommerup I.C. and Abbot L.K. (1981). Prolonged survival and viability of VA mycorrhizal hyphae after root death. *Soil Biology & Biochemistry* 13: 431-433.

**INTERACTIONS PLANTES  
MICROORGANISMES**

**SENEGAL  
FEBRUARY 1992**

**ifs**

**Fondation Internationale pour la Science**

# **INTERACTIONS PLANTES MICROORGANISMES**

## ***INTERACTIONS BETWEEN PLANTS AND MICROORGANISMS***

**Compte rendu du séminaire régional organisé par  
la Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
et l'Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)**

**Dakar, Sénégal  
17-22 février 1992**

Organisateurs:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)

Co-financé par:

Institut Français de Recherche Scientifique  
pour le Développement en Coopération (ORSTOM)  
Islamic Educational, Scientific and Cultural Organization (ISESCO)  
Centre Technique de Coopération Agricole et Rurale (CTA)

Publié par:

Fondation Internationale pour la Science (IFS)  
Grev Turegatan 19, 114 38 Stockholm, Sweden

Rédaction:

Judith N. Wolf

Les communications qui figurent dans cette publication ont été reproduites telles que soumises et n'ont pas été revues par des pairs, ni révisées du point de vue scientifique par la Fondation Internationale pour la Science (IFS). Les opinions exprimées n'engagent que les auteurs et pas la Fondation Internationale pour la Science (IFS).

La loi du 11 mars 1957 n'autorisant, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, d'une part, que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective" et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, "toute représentation ou reproduction intégrale, ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droits ou ayants cause, est illicite" (alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code Pénal.

ISBN: 91 85798 31 2