

METHODE DE COLORATION POUR L'OBSERVATION ET LE COMPTAGE DES ENDOMYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES SUR RACINES DE MAÏS

*Stéphane Thunot¹, Josiane Mortier² Christian Plenchette², Alain Mollier¹,
Christian Morel¹ & Sylvain Pellerin¹*

RESUME

Cette méthode permet d'observer et de quantifier les Mycorhizes à Vésicules et Arbuscules sur des racines de maïs sous loupe binoculaire (X60).

Cette technique consiste à conserver le squelette de la racine et à colorer toutes les formes du champignon mycorhizien (vésicules, hyphes, spores).

Pour ce faire la destruction des organites des tissus racinaires est obtenue par trempage dans une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) suivie d'une coloration des parois des champignons mycorhiziens.

La méthode employée pour la quantification du pourcentage de la longueur de racine portant des endomycorhizes à Vésicules et Arbuscules est la méthode de Tennant (1975).

Le comptage est effectué sous loupe binoculaire (grossissement entre X40 et X60).

MOTS CLES : Coloration, champignon mycorhizien à vésicules et arbuscules (MVA), racine, grid-line intersect.

1. INTRODUCTION

Les champignons sont des organismes hétérotrophes. Ne pouvant pas assimiler directement le CO₂ atmosphérique, ils utilisent la matière organique comme source de carbone et d'énergie. Les champignons peuvent entretenir deux grands types de relation avec la plante hôte. Lorsqu'ils tirent partie de la physiologie de la plante hôte sans retour pour celle-ci le phénomène est appelé parasitisme. En revanche si l'association est à bénéfice réciproque pour les deux espèces associées, le phénomène est appelé symbiose mutualiste (Smith et Read, 1997).

Dans ce dernier cas, ces champignons mycorhiziens à arbuscules (MA) s'associent de manière intime aux racines des plantes pour former un nouvel organe appelé mycorhize à arbuscules.

Une mycorhize est constituée d'une racine colonisée et des structures fongiques de transport (mycélium), de transfert (arbuscule) et de stockage (la vésicule) et par un réseau de mycélium se développant dans le sol au voisinage des racines appelé sol rhizosphérique (figures 1 et 2).

Le champignon hétérotrophe reçoit de la plante autotrophe des glucides issus de la photosynthèse et d'autres substances qu'il utilise pour sa nutrition hétérotrophique.

En explorant un plus grand volume de sol, par l'intermédiaire du réseau mycélien, la mycorhize permet à la plante une meilleure interception des éléments minéraux dont la mobilité dans le sol est faible (par exemple le phosphore). Il existe trois types de mycorhizes : les ectomycorhizes, les endomycorhizes et les ectendomycorhizes. Les ectomycorhizes sont principalement caractérisées par un manteau fongique périphérique, un réseau intercellulaire appelé réseau de Hartig et sont présents uniquement sur les arbres.

¹INRA ENITA Bordeaux UMR Transfert sol-plante et Cycle des Eléments Minéraux dans les écosystèmes cultivés. BP 81 33883 Villenave d'Ornon cedex sthunot@bordeaux.inra.fr

²INRA Dijon UMR Biologie et gestion des adventices BP 86510 21065 Dijon cedex plenchette@dijon.inra.fr

Les endomycorhizes montrent un champignon principalement intracellulaire et se rencontrent sur des arbres, des arbustes, des plantes maraîchères et des plantes de grandes cultures. Les ectendomycorhizes réunissent les caractéristiques des ecto et endomycorhizes (Strullu, 1991, p 24-28).

Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules sont classées dans les Zygomycètes, ordre des Endogonades, famille des Endogonacées.

Les mycorhizes (MVA) participent au cycle des végétaux dans 95% des cas. Ces champignons MVA sont présents naturellement dans tous les sols. Les champignons mycorhiziens vivent en symbiotes obligatoires, ils ne se développent que sur des plantes vivantes.

Les structures produites par les champignons endomycorhiziens sont difficilement observables sur des racines fraîches. Elles sont masquées par les pigments naturels et le contenu des cellules racinaires. La méthode proposée consiste à rendre observable le champignon mycorhizien sur des racines de maïs. Dans une première étape le contenu des cellules et les pigments des parois des cellules racinaires sont éliminés. Les structures internes des tissus de la plante deviennent alors visibles. Les composés du champignon peuvent être observés après une coloration de la chitine des parois du champignon.

A partir de ces observations il est possible d'estimer le pourcentage de la longueur racinaire colonisée par un champignon mycorhizien en utilisant la méthode grid-line intersect (Tennant 1975, Newman 1965).

2. LISTE DES MATERIELS ET REACTIFS NECESSAIRES POUR LA PREPARATION DES RACINES ET LA COLORATION DES ENDOMYCORHIZES

2.1. Matériels et réactifs nécessaires

Etuve électrique ventilée et réglable à 90°C; pilulier en verre de 30 ml avec bouchon à vis; pipettes permettant de délivrer 20 ml; fioles jaugées à 1000 ml classe A; pinces pour saisir les piluliers; pinces fines (type Dumont®) pour la manipulation des racines; passoire type cuisine (diamètre 60 mm) avec mailles de 1mm (maille en plastique); papier filtre de type Whatman N°40, diamètre 110 mm (filtration moyenne); boîte de Pétri quadrillée à 1/2 pouce (1.27 cm); loupe binoculaire X40 minimum; compteur manuel; balance 1/10 g.

Hydroxyde de potassium KOH (RP Normapur, en pastilles); Glycérol C₃H₈O₃ (98%, Rectapur); Acide lactique C₃H₆O₃ (90%, Rectapur); Fuchsine S acide RAL.

2.2. Préparation des solutions

- Préparation de 1000 ml de la solution KOH (10%): peser 100 g de KOH, les dissoudre dans 800 ml d'eau distillée puis compléter à 1000 ml dans une fiole jaugée (attention cette réaction est exothermique).

- Préparation pour 1000 ml de la solution colorante : peser 333 g d'acide lactique dans un bécher de 1000 ml, 333 g de glycérol dans un autre bécher de 1000 ml. Puis peser 500 mg de fuchsine dans un bécher de 150 ml. Verser l'ensemble des produits dans une fiole de 1000 ml et compléter avec de l'eau distillée.

- Préparation pour 1000 ml de solution de conservation des racines : faire la même préparation que la solution colorante sans les 500 mg de fuchsine.

2.3. Prélèvement des racines

Il doit être effectué selon une méthode répétable, d'un point de vue qualitatif et quantitatif.

Le prélèvement se fait à la bêche plate ou un cylindre. Ces tranches de sol/racines doivent être représentatives de la surface racinaire de la plante étudiée.

La séparation des tranches sol/racine est effectuée au laboratoire (cf. 3. Préparation des racines et coloration). L'échantillon final avoisine les 6 g de matière fraîche de racine.

3. PREPARATION DES RACINES ET COLORATION

Placer l'échantillon de sol/racines sur un tamis de maille de 1 mm. Laver à l'eau claire (eau de ville) sans trop de pression pour séparer le sol des racines. Mettre éventuellement un récipient sous l'échantillon pour récupérer le sol et/ou les spores sur un filtre de 50 µm.

Une fois que l'échantillon de racines est propre, le placer sur du papier absorbant. Puis homogénéiser l'échantillon et prendre un aliquote (méthode des quartiers) de 2 g de matière fraîche de racines. Mettre celui-ci dans un pilulier (30 ml) en verre type « pyrex » avec bouchon à vis métallique (ou équivalent, mais résistant à 90 °C).

Ajouter la solution de KOH à 10 %, jusqu'à recouvrement de l'échantillon.

Fermer le pilulier sans visser complètement le bouchon, l'ensemble des piluliers est placé sur un plateau (en cas de débordement).

Mettre à l'étuve (90°C) pendant 1 heure (le temps que passe l'échantillon à l'étuve est à adapter selon le type et l'âge des racines prélevées).

Cette attaque a pour but de vider la cellule de son cytoplasme et d'extraire les tanins des parties lignifiées des racines.

Une fois le passage à l'étuve terminé, laisser refroidir 15 min les échantillons et commencer le rinçage à l'eau claire (eau de ville).

Verser le contenu du pilulier dans une petite passoire en plastique de type « cuisine ».

Rincer abondamment l'échantillon de racines.

Les racines sont récupérées à l'aide d'une pince fine et replacées dans le pilulier.

Il faut vérifier que l'attaque est suffisante (les racines sont jaunies par l'attaque de la potasse).

La fin de cette réaction est déterminée par une observation à la loupe binoculaire, les racines doivent être translucides, les vaisseaux des racines sont visibles. Il est fortement conseillé de faire une série d'échantillons avec des temps de passage à l'étuve différents puis de les observer à la loupe binoculaire.

Une fois le rinçage à l'eau claire (eau de ville) terminé ne pas vider complètement l'eau du pilulier.

Mettre quelques gouttes d'acide lactique dans le pilulier pour acidifier le milieu en vue de la coloration par la Fuchsine (ce colorant pénètre plus profondément en milieu acide).

Laisser agir 5 min, les racines deviennent blanches.

Rincer l'échantillon à nouveau à l'eau claire (eau de ville) comme décrit précédemment.

Remettre l'échantillon égoutté dans le pilulier et ajouter la solution colorante jusqu'à recouvrement de l'échantillon.

Mettre à l'étuve (90°C) pendant 30 min.

Laisser refroidir 15 min les échantillons

Commencer le rinçage de l'échantillon comme décrit précédemment.

La solution colorante peut être recyclée. Pour ce faire, prévoir une fiole 1000 ml avec un entonnoir et un papier filtre. On place la passoire au dessus de l'entonnoir et on verse le contenu du pilulier.

Rincer abondamment à l'eau jusqu'à ce que l'eau de rinçage ne soit plus colorée.

Récupérer les racines dans la passoire avec une pince fine et les placer dans un pilulier.

Recouvrir l'échantillon avec de la solution de conservation.

L'échantillon est alors prêt pour l'observation à la loupe binoculaire.



Figure 1 : *Vésicules extracellulaires avec mycélium sur racines de maïs (grossissement X60), après coloration des racines (photo S.Thunot).*

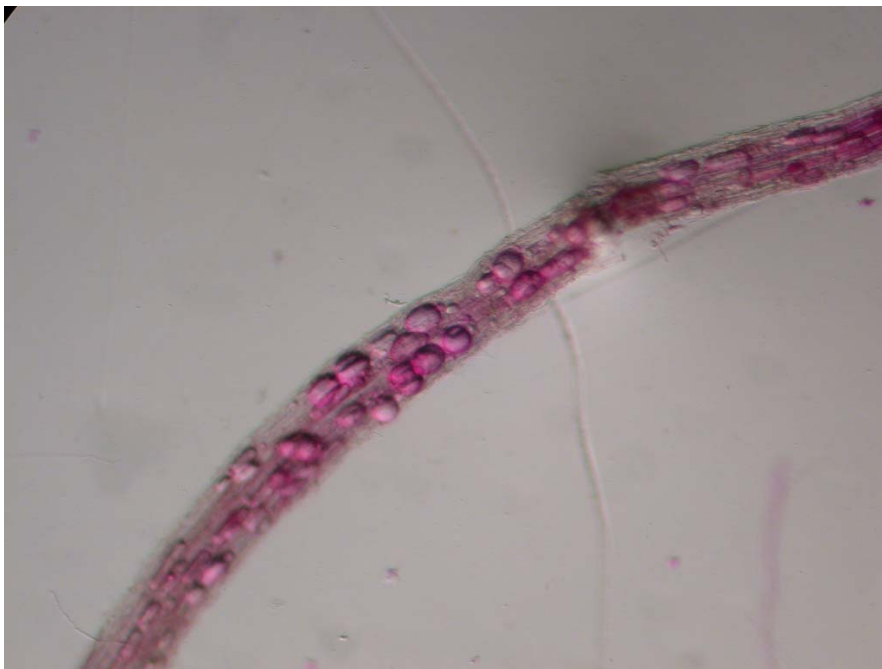


Figure 2 : *Vésicules intracellulaires sur racine de maïs (X60X2 en numérique), après coloration des racines (photo S.Thunot)*

4. COMPTAGE DES ENDOMYCORHIZES A VESICULES ET ARBUSCULES : GRIDLINE INTERSECT

Méthode d'observation sous loupe binoculaire (X 40) permettant de définir le pourcentage et la longueur de racines mycorhizées.

4.1 Principe de la méthode

Estimer la longueur de racine observée par la méthode de Tennant (1975) et noter le pourcentage de cette longueur présentant une trace d'infection mycorhizienne.

Tracer sur une boîte de Pétri un quadrillage d'un ½ pouce (1.27 cm).

Placer les racines, préalablement colorées et coupées en morceaux d'environ 5 mm dans la boîte de Pétri.

Étaler les racines de façon aléatoire dans la boîte de Pétri, en évitant que les morceaux de racines ne se touchent.

Définir un sens de lecture par rapport aux lignes du quadrillage. Il faut observer 100 intersections de racines / quadrillage (correspondant à une longueur de 100 cm de racine).

Méthode de Tennant (1975) :

$$L = (3.14 n S) / (2 l)$$

L = longueur de racine (cm)

n = nombre d'intersections

S = surface de la boîte de Pétri (cm²)

l = longueur de toutes les lignes formant le quadrillage de la boîte de Pétri (cm)

Observer l'intersection formée par la racine et le quadrillage (cf : illustration de la méthode de comptage figures 3 et 4) : tous les stades de développement mycorhizien (vésicules, mycélium ou spores) que l'on peut observer **à l'intérieur de la racine**, seront comptés. Noter RM si la Racine est Mycorhizée, noter NM pour une racine Non Mycorhizée. Le résultat de l'observation est interprété en pourcentage de longueur de racines mycorhizées.

Sur 100 intersections on aura :

$$\%L = 100 RM / (RM + NM)$$

RM = racine mycorhizée

NM = racine non mycorhizée

% L = pourcentage de la longueur de racines mycorhizées

Remarque : On peut également noter un niveau de mycorhization en établissant une échelle de 0 à 100%, (avec un intervalle de 20%) du taux d'infection sur la totalité de chaque fragment de racine mycorhizée observé. Cet indice permet d'avoir une appréciation de l'intensité de l'infection des racines.

4.2 Illustration de la méthode de comptage

Suivre dans un premier temps les lignes horizontales (figure 3), puis les lignes verticales (figure 4). Compter 100 intersections entre les fragments de racines et le quadrillage et noter RM si la racine est mycorhizée ou NM si la racine n'est pas mycorhizée à ces points d'intersection.

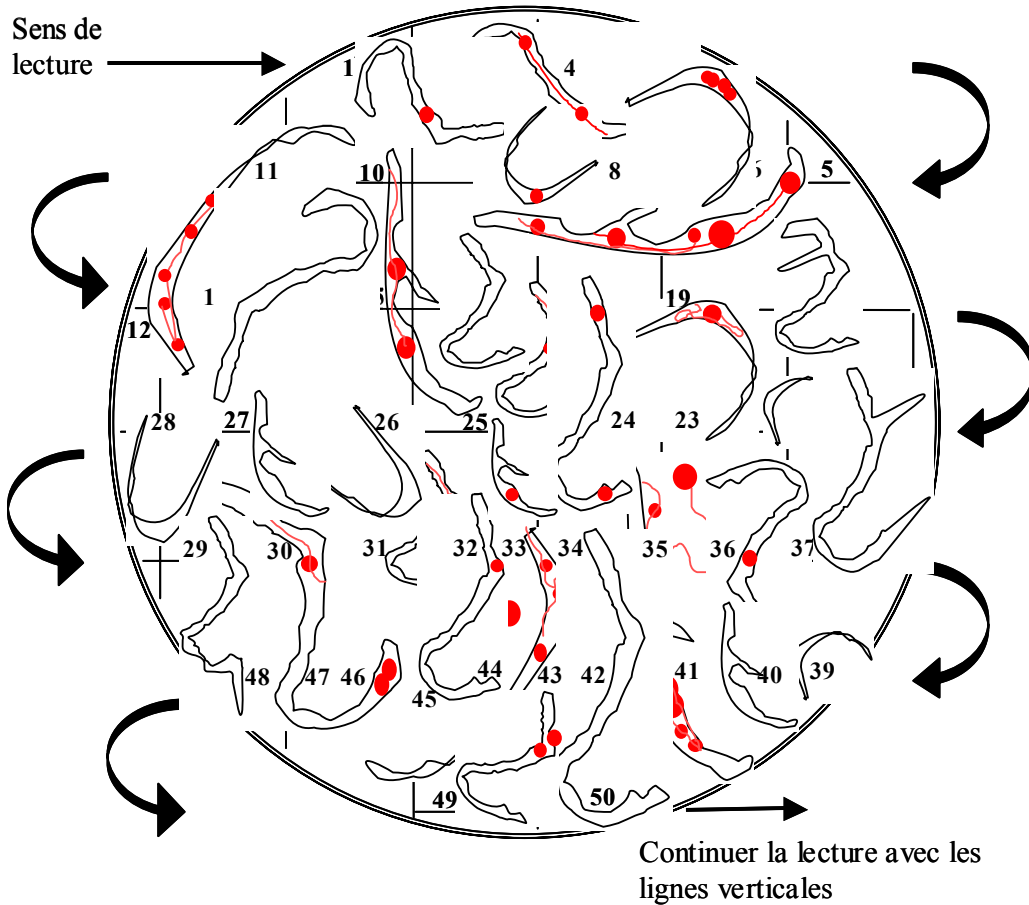


Figure 3 : Lecture dans le sens horizontal

Résultat du comptage horizontal											
N°	RM	NM	N°	RM	NM	N°	RM	NM	N°	RM	NM
1		X	14	X		27		X	40		X
2		X	15	X		28		X	41	X	
3		X	16		X	29		X	42		X
4	X		17	X		30	X		43		X
5	X		18	X		31		X	44		X
6		X	19	X		32	X		45		X
7		X	20		X	33	X		46	X	
8		X	21		X	34		X	47		X
9		X	22		X	35		X	48		X
10	X		23		X	36	X		49		X
11		X	24		X	37		X	50		X
12	X		25		X	38	X				
13		X	26		X	39		X			
Total RM (figure 3) =16											

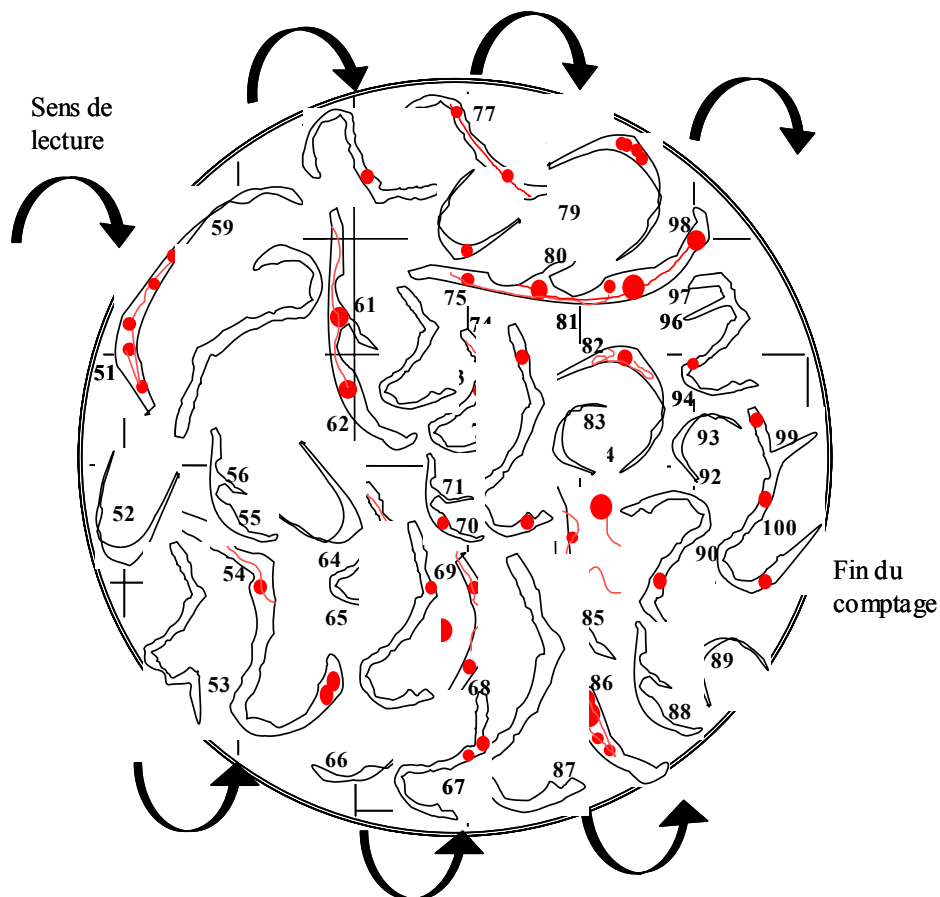


Figure 4 : Lecture dans le sens vertical

Résultat du comptage vertical											
N°	RM	NM	N°	RM	NM	N°	RM	NM	N°	RM	NM
51	X		64		X	77	X		90		X
52		X	65		X	78		X	91		X
53		X	66		X	79		X	92		X
54	X		67	X		80		X	93		X
55		X	68	X		81	X		94		X
56		X	69	X		82		X	95	X	
57		X	70		X	83		X	96		X
58	X		71		X	84		X	97		X
59		X	72		X	85	X		98	X	
60		X	73		X	86	X		99		X
61		X	74	X		87		X	100		X
62	X		75	X		88		X			
63		X	76	X		89		X			
Total RM (figure 4) =16											

Calcul du pourcentage de la longueur de racine mycorhizée :

$$\%L = 100 \text{ RM} / (\text{RM} + \text{NM}) = 100 * 32 / (32 + 68) = 32\%$$

5. LISTE DES REFERENCES CITEES

Newman, E.I. 1965 A method of estimating the total length of root. *Journal of Applied Ecology*. **3**. 139-142

Strullu, D.G., Garbaye, J., Perrin, R. et Plenchette, C. 1991. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 24-28, 250p

Smith & Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London, 605p

Tennant, D. 1975. A test of a modification line intersect method of estimating root length. *Journal of Applied Ecology* **63**. 995-1001.