

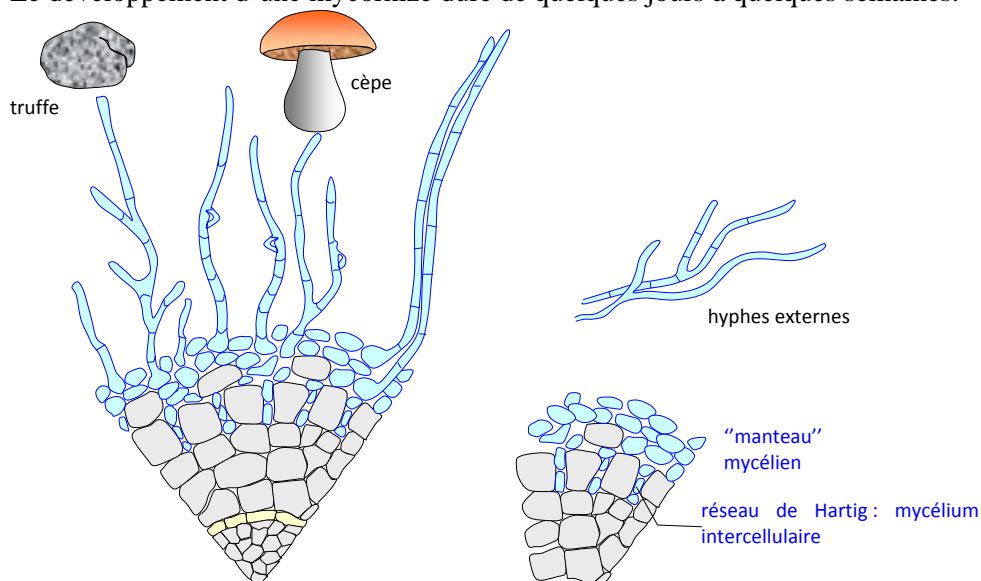
Les mycorhizes (du grec *mukes* = champignon et de *Rhiza* = racine) sont des organes mixtes résultant de l'association entre les racines d'une plante et les filaments mycéliens d'un champignon. Entre 80% et 90% des espèces de plantes sont mycorhizées. Cette association est décrite comme une symbiose c'est-à-dire que le bénéfice est aussi bien pour la plante que pour le champignon. Les capacités d'absorption en eau et en éléments minéraux des racines sont améliorées grâce au réseau d'hyphes (filaments du champignon) qui augmente leur zone de prospection et grâce aux capacités d'altération des matières organiques du champignon. La présence du champignon permet également de protéger la plantes (polluants, parasites...) et d'une manière générale, contribue à une amélioration de la santé et de la croissance des plantes. En retour, le champignon bénéficie des nutriments exsudés par les racines (sucres, acides aminés, acides gras, facteurs de croissance ...).

Il existe plusieurs types de mycorhizes en fonction du couple plante/champignon. Selon le type de mycorrhization, une transformation morphologique de la racine est observée ou non.

Détection d'ectomycorrhizes

Source : UMR Eco&Sols

Dans le cas de l'ectomycorhization, il y a modification morphologique de la racine qui peut être observées à l'œil nu ou à l'aide d'une loupe bioculaire. La plupart des ligneux (angio et gymnospermes) sont mycorhizés. Les ectomycorrhizes sont facilement observables sur les racines de pin et d'écéa par exemple. Les modifications morphologiques sont variées selon les espèces d'arbre et de champignons : formation d'un épais manteau fongique qui entoure les radicelles, disparition des poils absorbants... Les champignons impliqués dans ce type de mycorhizes ont souvent des fructifications (organe de production des spores) bien connues en forêt, dont certains sont comestibles et très appréciés. Ce sont souvent des Basidiomycètes (*Boletus*, *Pisolithus*, *Laccaria*, *Rhizopogon*, *Amanita*, *Lactarius*, *Russula*) ou des Ascomycètes (*Tuber*, *Elaphomyces*). L'échange des éléments entre le champignon et l'arbre passe par une zone spécifique appelée le réseau de Hartig (d'après T. Hartig, botaniste forestier allemand). Ce réseau est composé d'un épais tissu fongique qui s'installe entre les cellules racinaires et les radicelles, assurant ainsi un contact étroit entre les deux partenaires. Le développement d'une mycorhize dure de quelques jours à quelques semaines.



Source : modifié d'après de **F. Le Tacon**, INRA Nancy- La Recherche n° 166 mai 1985
repris dans l'excellent livre de **F. HALLE AUX ORIGINES DES PLANTES** éditions Fayard 2008



Source : Egly et Brunner, 2002; ISSN 1012-6554

Fig. 4. Fructifications et mycorhizes (d'en haut en bas) de la Russule ocre et blanchâtre (*Russula ochroleuca*); du Cortinaire à odeur d'anis (*Cortinarius odorifer*), un représentant du genre le plus riche en espèces symbiotiques; du Laccare améthyste (*Laccaria amethystina*), qui colonise principalement les racines des plantules de jeunes arbres; de la fructification souterraine de *Arangeliella bozzarui*; et de la Truffe du Périgord (*Tuber melanosporum*).



Source : A. Robin (UMR Eco&Sols)

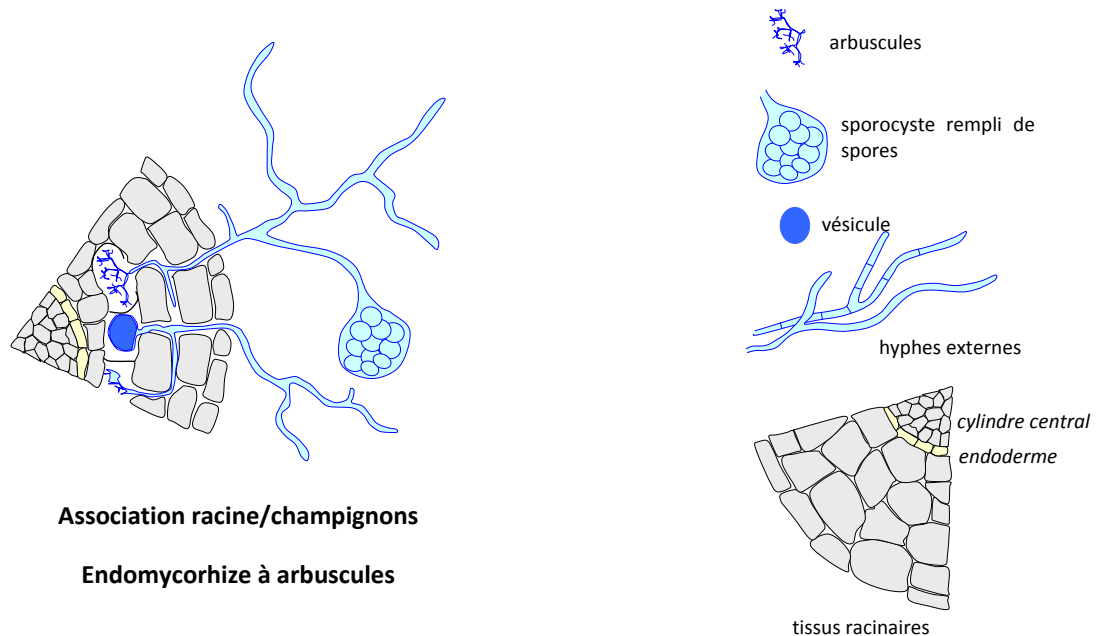
Détection d'endomycorhizes par coloration à l'encre noire

Source : UMR Eco&Sols

1. Objet et domaine d'application

Dans le cas de l'endomycorhization, aucune modification morphologique de la racine ne peut être observée directement. Il est nécessaire de passer par une étape de coloration pour observer les structures mycorrhiziennes. Les filaments mycéliens souterrains du champignon ne forment pas de manchon autour de la racine comme dans le cas des ectomycorhizes, mais franchissent les parois

des cellules racinaires, d'où leur nom, « **endomycorhize** », qui traduit la présence du champignon à l'intérieur des cellules de la plante-hôte. Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules forment le type dominant qui intéresse la plupart des plantes à l'exception des crucifères. Les champignons impliqués dans cette association sont des Glomeromycètes (par ex. *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospor*). Bien qu'intracellulaire, l'hyphe ne pénètre pas le cytoplasme de la cellule. Il se met en place une zone d'échange entre le champignon et la racine se fait au niveau d'arbuscules (ramifications intracellulaire) et les vésicules sont des organes de réserve.



Association racine/champignons

Endomycorhize à arbuscules

Source : modifié d'après de **F. Le Tacon**, INRA Nancy- La Recherche n° 166 mai 1985
repris dans l'excellent livre de **F. HALLE AUX ORIGINES DES PLANTES** éditions Fayard 2008

Cette fiche propose une technique de coloration permettant d'observer des structures fongiques (arbuscules, hyphes, vésicules) dans des racines de plante. Après coloration et observation il est de plus possible d'estimer le taux de mycorhization de la plante en calculant des indicateurs de mycorhization.

2. Hygiène et sécurité

La mise en œuvre de la technique de coloration implique l'utilisation des produits chimiques suivant pouvant comporter un risque :

KOH
– N° CAS : 7758-99-8



Xi - Irritant



N - Dangereux pour l'environnement

Le port de blouse, gants et lunettes est indispensable lors des manipulations.

3. Matériel et produits nécessaires

- Racine de plante (par exemple: du plantain, du poireau)
- Une balance de précision (au dixième de milligramme) avec spatules et coupelles de pesée
- **Microscope**
- Petits flacons en verre ou piluliers de 60 mL, avec bouchon
- Bêchers de 150 mL

- Petite passoire
- Ciseaux à pointes fines
- Pinces fines
- **Étuve réglable à 90°C**
- Grande boîte de Pétri
- Lames en verre et grandes lamelles
- Papier filtre
- Un marqueur
- Vernis à ongle
- Pipetman de 0,2 et 1 mL et embouts plastique
- KOH 10% dans eau déminéralisée
- Vinaigre blanc de ménage (5% acide acétique)
- Solution d'encre noire (marque Scheaffer) à 8% dans vinaigre blanc
- Glycérol 100%

4. Mode opératoire

Durée : 3h, la préparation et l'observation peuvent être découpée. La préparation se conserve une petite année dans de l'eau à 4°C. Les lames peuvent également être conservées pendant plusieurs mois à l'obscurité.

1. Destruction des structures cellulaires

- Déposer les racines dans une petite passoire et les laver soigneusement sous l'eau du robinet.
- Les égoutter sur papier filtre.
- Les placer dans un pilulier en verre et les recouvrir complètement de KOH à 10%. Boucher le flacon 40 minutes à l'étuve à 90 °C pour des jeunes plants (1 heure pour des plants plus âgés). Attention, bien boucher le flacon pour éviter les dégagements de KOH. Après avoir sorti le flacon de l'étuve, le placer sous un filet d'eau froide avant de les ouvrir pour éviter d'avoir trop de vapeur de KOH (corrosives). En l'absence d'étuve, cette étape peut être réalisée dans un bain marie.
- Placer les racines dans une petite passoire et rincer 2 à 3 fois à l'eau afin d'éliminer toute trace de KOH
- Egoutter les racines et les déposer dans un pilulier.

Cette étape permet de déstructurer les structures cellulaires et de transformer les chitines présentes dans la paroi des champignons en chitosane par une étape d'hydrolyse basique avec le KOH. Des groupements amines sont alors libérés sur lesquels le colorant pourra se fixer permettant ainsi la coloration des structures fongiques.

2. Coloration à l'encre noire

- Recouvrir les racines de la solution d'encre noire à 8% dans du vinaigre blanc, fermer le pilulier et le placer 15 minutes à l'étuve à 90°C.
- Bien rincer à l'eau déminéralisée additionnée de quelques gouttes de vinaigre blanc. Prévoir au moins 5 rinçages, les 2 premiers rapides pendant 1 ou 2 minutes et les 3 derniers environ 5 minutes pour éliminer l'excès de coloration.
- Déposer les racines dans une boîte de Pétri avec un peu d'eau.

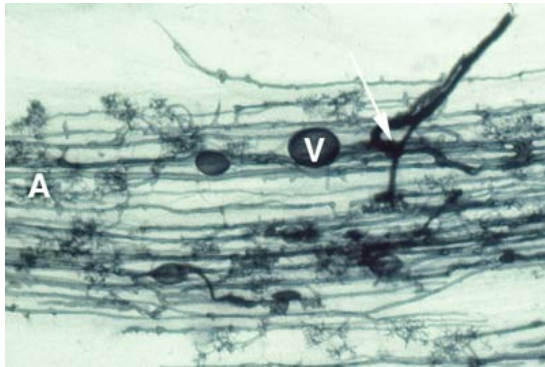
3. Montage sur lame

- Déposer sur la lame à l'aide d'une pipetman du glycérol (une fine bande d'env 1 cm de largeur)
- Récupérer les petites racines non lignifiées

- Les découper en petits fragments d'environ 1 cm puis les déposer à la surface du glycérol 10-15 petits fragments perpendiculairement à la lame. Faire 2 lames par plante
- Ecraser entre lame et lamelle. Fermer avec vernis pour conservation.

4. Observation au microscope

Le champignon apparaît coloré en bleu. On peut observer les arbuscules, plus rarement des vésicules. Arbuscules et vésicules peuvent cohabiter sur un même fragment.

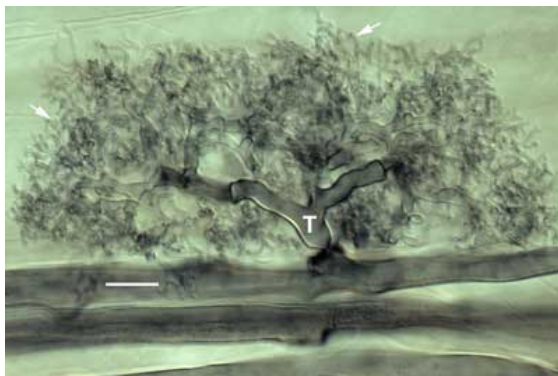


Vue d'ensemble (vésicule environ 50 μm)

V = Vésicule (organe de stockage)

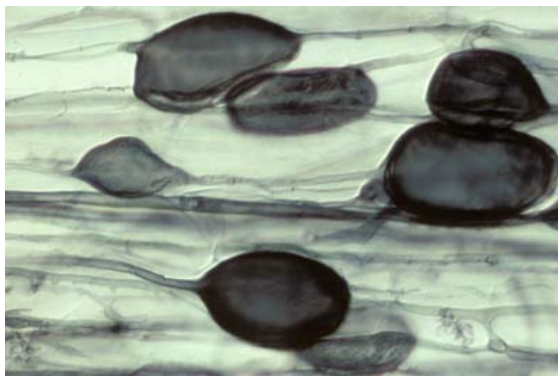
A = Arbuscule (zone d'échange entre la plante et le champignon)

La flèche montre un hyphé de champignon entrant dans la racine



Arbuscule

T = « tronc » de l'arbuscule ; la barre=10 μm



Vésicules (environ 50 μm)

Eventuellement...si ça vous intéresse on vous expliquera comment reconnaître les 5 classes de taux d'infection.

5. Estimation du taux de mycorhization des racines

Trois paramètres liés à la mycorhization peuvent être mesurés : la fréquence de mycorhization (F), l'intensité de mycorhization (M) et la teneur en arbuscules (A) (Trouvelot *et al.* 1986).

1. Observation de la densité de colonisation du cortex par le champignon :

- Observer au microscope au moins 30 fragments racinaires d'environ 1 cm chacun après coloration.
- Attribuer à chaque fragment une note de classe comprise entre 0 et 5 selon l'estimation de la proportion de cortex racinaire colonisé par le CAM (voir schéma ci-dessous):
 - 0 : pas d'infection
 - 1 : trace
 - 2 : moins de 10%
 - 3 : de 10 à 50%
 - 4 : de 51 à 90%
 - 5 : plus de 90%

2. Observation de la qualité arbusculaire

La présence des arbuscules est notée simultanément en indiquant leur classe de fréquence de A0 à A3 (voir schéma ci-dessous).

- A0 : 0%
- A1 : 10%
- A2 : 50%
- A3 : 100%

3. Calcul des paramètres de mycorhization :

Compléter une feuille de comptage et calculer les paramètres suivants:

F fréquence de mycorhization :

$$F\% = (n/N) \times 100$$

N : nombre de fragments observés

n : nombre de fragments mycorhizés

M intensité de mycorhization :

$$\text{Globale : } M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N$$

$$\text{Fragments mycorhizés : } m\% = M \times N/n = M \times 100/F$$

n_1, n_2, n_3, n_4, n_5 sont les nombres de fragments notés de 1 à 5 respectivement.

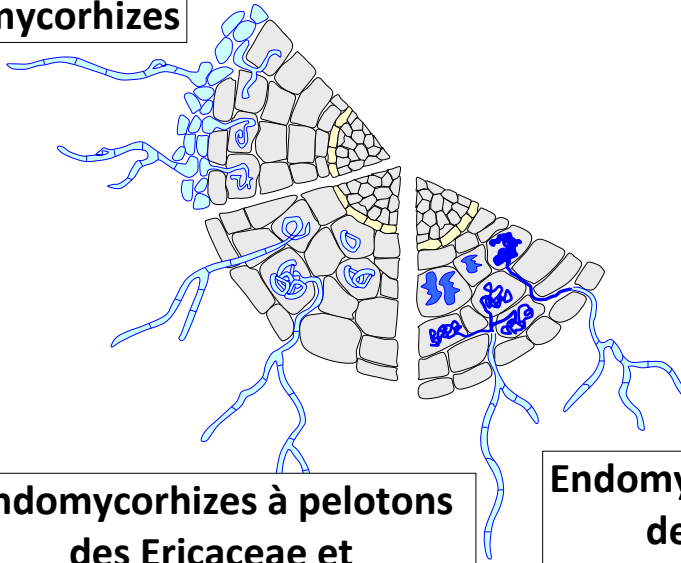
A intensité arbusculaire :

$$\text{Partie mycorhizée } A\% = (100m_{A3} + 50 m_{A2} + 10 m_{A1})/100$$

m_{A3}, m_{A2} et m_{A1} représentent le % de mycorhization de qualité arbusculaire donnée respectivement pour chaque classe A1, A2 et A3 selon : $m_A = ((95n_{5A} + 70 n_{4A} + 30 n_{3A} + 5n_{2A} + n_{1A1})/N) \times 100/m$

Il existe d'autres types de mycorhize....

Ectendomycorhizes



**Endomycorhizes à pelotons
des Ericaceae et
hélianthèmes**

**Endomycorhizes à pelotons
des Orchidaceae**

Annexes : Schéma de lecture des différentes classes de mycorrhization
Feuille de comptage

• Documents de référence

- Vierheilig H *et al.* (1998). Ink and Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. *Applied & Environmental Microbiology*: 64: 5004–5007
- Site de l'Inra de Dijon : www2.dijon.inra.fr/Mychintec
- Exemple d'image sur le site : <http://mycorrhizas.info/vam.html>
- Les schémas sont d'après les schémas de **F. Le Tacon**, INRA Nancy- La Recherche n° 166 mai 1985 et repris dans l'excellent livre de **F. HALLÉ** *AUX ORIGINES DES PLANTES* éditions Fayard 2008.