

Coloration des mycorhizes

Alix Helme-Guizon et Marc-André Selosse

Quand on traite de la nutrition des végétaux, on enseigne aux élèves qu'elle se fait dans 90 % des cas par des mycorhizes, mais en TP on leur montre... des poils absorbants ! Au mieux, on montre une photo d'ectomycorhize, mais ce type d'association ne concerne que les arbres des forêts tempérées (5 % de la flore), alors que près de 80 % des végétaux possèdent des endomycorhizes à arbuscules. Comme aucune lame n'est disponible dans le commerce, mais que les racines endomycorhizées sont extrêmement communes (nos cours le prétendent en tout cas !), nous vous proposons de les faire vous-mêmes. Il est aussi possible de récupérer des spores de champignons endomycorhiziens dans le sol, et bien sûr de colorer des ectomycorhizes.

Quelle que soit la mycorhize ou la partie végétale souterraine observée, souvenez-vous que l'atmosphère est plus desséchante que le sol : placez aussi vite que possible les structures racinaires dans de l'eau, après extraction du sol ou pour observation à la loupe binoculaire. Rappelez-vous que le sol est aussi un milieu assez stable : les organes souterrains les plus fragiles se disloquent facilement lorsqu'on les manipule, ils sont moins résistants que les parties aériennes.

Coloration des endomycorhizes

Principe de la méthode

Il s'agit de décolorer toutes les cellules en conservant leurs parois, puis de colorer les parois des cellules du champignon grâce à un colorant de la callose, un glucane majeur de celles-ci. Les champignons concernés sont des Eumycètes du groupe des Gloméromycètes ou Glomales.

Matériel

– une plante quelconque, excepté une Brassicacée ou une Chénopodiacée (groupes non-symbiotiques, avec des poils absorbants seulement). Avec une Fabacée, on observera aussi des nodosités. Nous avons aussi eu de bons résultats avec du Pâturin, et d'excellents avec du Plantain et une racine drageonnante (superficielle) de Merisier. Éviter surtout les sols très riches, où les plantes se nourrissent

► **Mots clés** : ectomycorhize, endomycorhize, rhizogénèse

■ **Alix Helme-Guizon**, professeure en BCPST-Véto à Angers
Marc-André Selosse, professeur, l'Université Montpellier II

seules, sans plus établir de mycorhizes. Garder les racines les plus fines qui sont les plus mycorhizées : pour cela, éviter de tirer les racines ou d'arracher les plantes du sol, il vaut mieux extraire une motte puis dégager les racines sous l'eau ;

– si vous souhaitez conserver les lames, faites le montage dans du lactoglycérol qui limite l'évaporation : 1 volume d'acide lactique 100% + 1 volume glycérol (ou glycérine) + 1 volume d'eau ;

– du bleu coton : bleu de méthyle (Color Index 42780) 1 % et acide acétique 3 % ;

– de la potasse KOH 10 % ;

– des tubes à essai dans un portoir allant dans un bain marie à 90° C. Mettez un thermomètre dans le bain-marie, car quand les résistances sont entartrées elles ne montent qu'à 80° C !

– un tamis ou microplaine pour récupération et rinçage ;

– de l'eau acidifiée : eau distillée + un peu d'acide chlorhydrique très dilué.

Protocole

1. Laver précautionneusement les racines et prendre les plus jeunes, les couper à une longueur de 1-2 cm

2. Les mettre dans un tube à essai avec la potasse 10 %, et chauffer au bain-marie 90° C durant 30 min (on peut optimiser ce temps, parfois 10-15 min suffisent si l'on est pressé et/ou si les racines sont fragiles). Cette opération détruit le contenu des cellules végétales et décolore les tanins des racines ligneuses. La solution devient alors brun-rouge.

3. Jeter la potasse et filtrer dans un tamis, rincer avec l'eau acidifiée pour neutraliser.

4. Remettre dans le bleu coton au bain marie 10 à 15 minutes. Filtrer à nouveau dans un tamis et rincer à l'eau distillée.

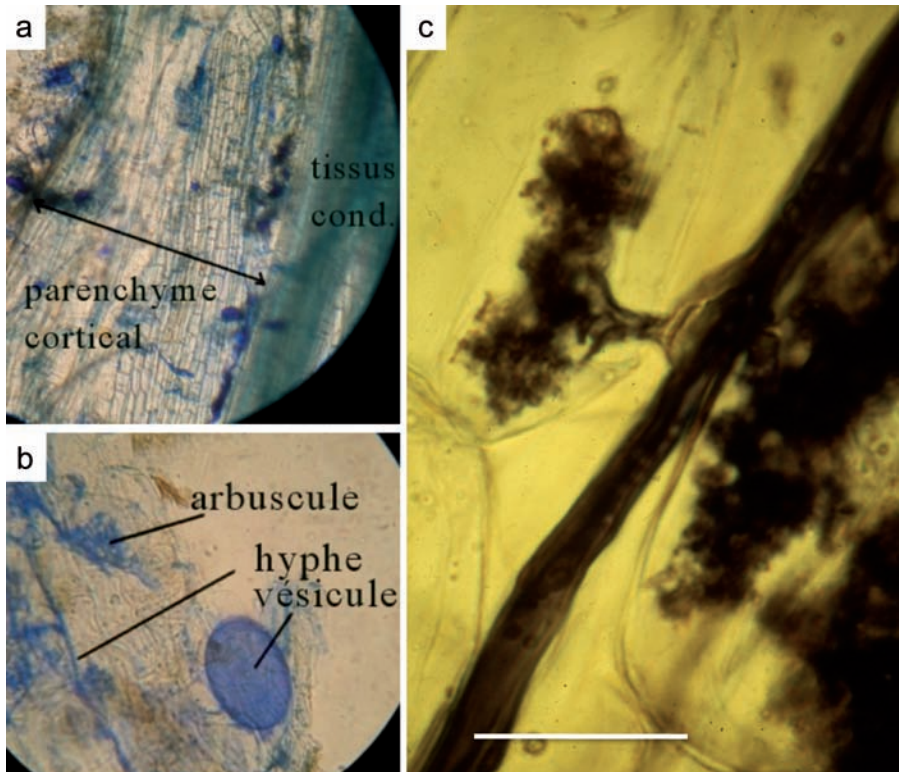
5. Pour une observation directe, monter dans l'eau. Si on souhaite observer plus tard ou conserver les lames, monter dans le lactoglycérol. Si c'est trop épais, écraser doucement avec le dos d'un crayon papier en bois, voire donner un coup sec avec une gomme carrée (pour ne pas casser la lamelle). Si on souhaite conserver la préparation plusieurs années, mettre une pince à linge sur la lamelle et du vernis à ongles transparent tout autour de la lamelle (le lactoglycérol est un peu miscible avec le vernis). Le lendemain déplacer la pince à linge et remettre une couche de vernis. L'un de nous a conservé des lames 15 ans avec cette technique !

Résultat

Le bleu coton marque le champignon mycorhizien, présent dans tout le parenchyme cortical, sans jamais entrer dans le cylindre central. On distingue (*fig. 1*) des arbuscules à l'intérieur de certaines cellules racinaires (structure d'échange entre partenaires)

et des vésicules entre les cellules (souvent, une goutte lipidique dedans : c'est une structure de réserve pour le champignon). On voit parfois aussi des hyphes externes, qui ne sont jamais cloisonnés. Il s'agit donc d'une endomycorhize à arbuscules.

Si les arbuscules paraissent nuageux (à la limite, une vague couleur bleue dans la cellule), c'est qu'ils sont trop lysés : diminuer le temps de décoloration. Une coloration directe peut être essayée sur les racines très claires.



1. Résultat standard de la coloration d'endomycorhizes

a) vue d'ensemble ; b) détail avec arbuscules et vésicule ; c) très bonne vue de détail d'un arbuscule dans une cellule végétale, la barre mesurant 50 µm (cliché c : J. Dexheimer)

Observation de spores de Gloméromycètes

Principe de la méthode

Les spores sont, avec les hyphes externes des racines, les structures qui vont permettre l'infection des nouvelles racines. Ces spores sont très grosses (une centaine de microns), car bourrées de réserves qui assureront une germination et une colonisation précoce de la racine en autonomie trophique. Elles peuvent donc être récupérées par tamisage, puis observées à la loupe binoculaire.

Matériel

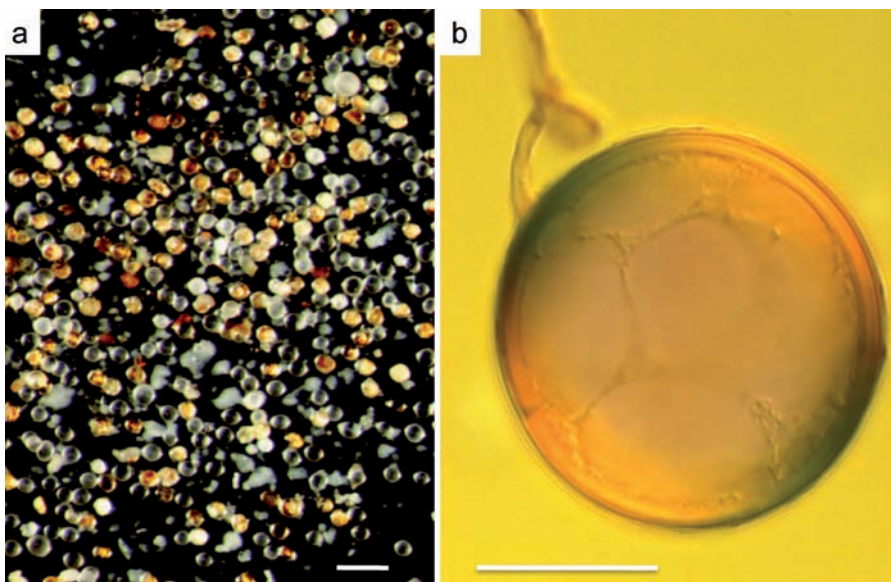
- du sol non traité : ni engrais (voir plus haut), ni pesticides...
- des tamis fins à maille à de 250, 150, et 50 μm .
- des boîtes de Pétri pour récupérer les fractions d'intérêt.

Protocole

Suspendre 0,25 l environ de sol (dont on a auparavant éliminé les gros blocs et morceaux visibles) dans 0,75 l d'eau. Homogénéiser puis laisser brièvement décanter et tamiser le surnageant sur trois tamis de 250, 150, et 50 μm (placés les uns au-dessus des autres, le plus fin en bas !). Laver à l'eau distillée chaque tamis puis recueillir chaque fraction à l'aide d'un peu d'eau (rincer le tamis à l'envers) dans une boîte de Pétri et l'observer sans coloration, à la binoculaire. On peut aussi l'observer au microscope optique, sans coloration (attention, vu la taille des spores, ne pas écraser la lame pour ne pas les détruire !).

Résultat

On observe, entre des débris de même taille, de grosses spores (*fig. 2*). Elles sont rondes et bourrées de réserves (si on écrase, une goutte lipidique sort), avec parfois d'un côté un filament ou une hernie : c'est le reste de l'hyphe qui a généré la spore à son extrémité.



2. Spores de Gloméromycètes

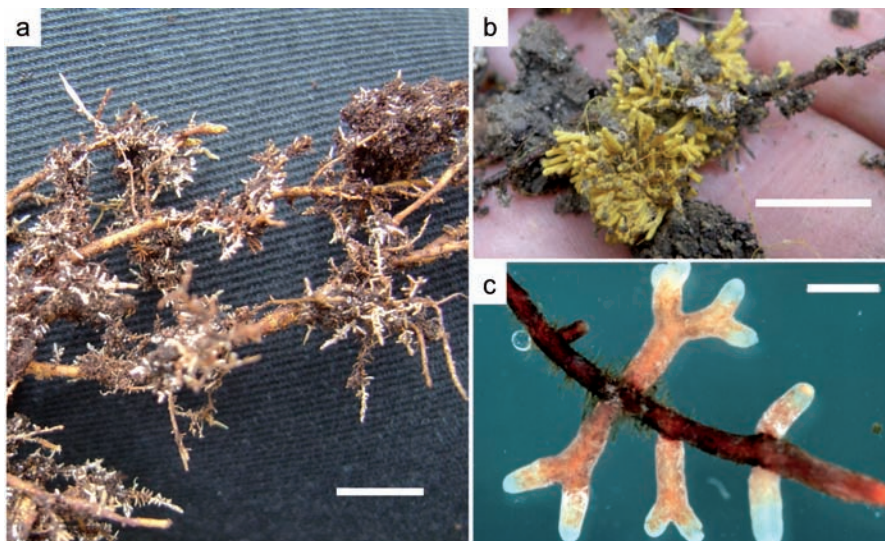
a) vue d'ensemble, la barre mesurant 200 μm , b) vue de détail avec hyphe génératrice fléchée, la barre mesurant 50 μm (clichés P.-E. Courty)

Coloration des ectomycorhizes

Bien qu'elles ne concernent que les arbres des régions tempérées (et de quelques forêts tropicales), les ectomycorhizes formées par des Ascomycètes et, le plus souvent, des Basidiomycètes, peuvent être montrées car elles sont faciles à observer à l'œil nu ou à faible grossissement. Pour cela, prélever en saison de végétation de préférence, et en sol pas trop riche, des petits chênes, sans tirer la racine (avec la motte), qui ont eu le temps de développer de belles racines dans un sol meuble.

On peut aussi chercher dans l'humus épais sous des Pins ou des Hêtres : là, dans les accumulations de matière organique, les mycorhizes se dissocient bien du sol. Elles sont souvent placées latéralement sur une racine traçante, à croissance continue, et sont rendues visibles par leur couleur différente (celle du champignon) et/ou leur aspect cotonneux (hyphes du champignon ; *figure 3a*). Souvent, leur forme est modifiée : elles sont très ramifiées (*fig. 3b*), voire dichotomiques sur le Pin (*fig. 3c*) ; il faut y voir l'effet d'analogues d'auxines produits par le champignon qui, en stimulant la rhizogenèse, démultiplie les sites d'interaction avec son hôte.

L'analyse peut se faire à l'œil nu sur le terrain mais le mieux est de ramener les échantillons et de les regarder sous la loupe binoculaire, dans une coupelle d'eau pour éviter le séchage. La morphologie est la plus parlante – et très variable d'une espèce de champignon à l'autre (*fig. 3*). On peut, sous la loupe, récupérer des mycorhizes et tenter des coupes : effectuer des coupes transversales, complètes ou non (les coupes incomplètes montrent des biseaux dont la marge, très fine, révèle la structure cellulaire). On voit au moins le manteau d'hyphes fongiques autour de la racine. Mais avouons-le : sans coupe fine ni fort grossissement, il est difficile de voir le réseau de Hartig, c'est-à-dire les hyphes pénétrant entre les cellules racinaires corticales, et dont le rôle d'échange est analogue à celui des arbuscules.



3. Ectomycorhizes de Chêne sur le terrain (a, b) et de Pin sous la binoculaire (c)

c) : noter la ramification dichotomique des racines latérales mycorhizées, blanches.

La barre mesure 1 cm pour a et b et 5 mm pour c.

c : cliché L. Peterson

On peut aussi écraser ou dilacérer une ectomycorhize afin de voir les hyphes. Pour l'écraser sans casser la lamelle : n'en mettez pas trop, écrasez en tapotant avec le dos d'un crayon papier en bois. Il est possible aussi de colorer des ectomycorhizes, mais ce n'est souvent pas nécessaire pour les plus frappantes. Couper les petites racines, ou reprendre les coupes, et les placer sur une lame. Colorer avec du rouge Ponceau à 0,1 % dans de l'acide acétique à 10 %. Si vous n'avez pas de rouge Ponceau, le bleu de toluidine (0,1 % dans du tampon acétate pH = 4,6) donne des résultats convenables mais moins spécifiques. Comme précédemment, monter dans l'eau pour une observation immédiate, ou dans du lactoglycérol pour une conservation longue.

Conclusion

Ces observations donnent accès aux champignons mycorrhiziens, une fraction importante de la biodiversité microbienne du sol. Elles permettent d'illustrer la définition d'une mycorhize, « un organe mixte formé par la racine d'une plante et un champignon du sol ». Elles mettent en évidence un aspect fonctionnel majeur, l'existence d'un contact étroit, formant une surface d'échange entre les partenaires, pour lesquels cet organe mixte a un rôle trophique.

Référence des protocoles

Le protocole de coloration des endomycorhizes a été développé par C. Grace et D. P. Stribley (1991 : A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, *Mycological Research* 95, 1160-1162).

Le protocole de coloration des ectomycorhizes a été développé par A. Daughtridge, S. Boese, S. Pallardy et H. Garrett (1986 : A rapid staining technique for assessment of ectomycorrhizal infection of oak roots, *Canadian Journal of Botany* 64, 1101-1103).

Des perfectionnements ponctuels ont été apportés par les auteurs ; merci de son assistance technique à Nadia PICHERY et à P.-E. COURTY pour ses images non publiées.

Documentation sur les mycorhizes

DUHOUX E. & NICOLE M. - *Atlas de biologie végétale, associations et interactions chez les plantes*, Dunod, 2004

FORTIN A., PLANCHETTE C. & PICHE Y - *Les Mycorhizes, la nouvelle révolution verte*, Editions Quae, 2008

SELOSSE M.-A. - *La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif*, Vuibert, 2000

Articles au format pdf en ligne à www.cefe.cnrs.fr/coev/MA_Selosse.htm