



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Université Mustapha Benboulaïd (Batna 2)

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Ecologie et Environnement

TP

**Symbiose plante-
microorganismes et
Phytopathologie**

M1 Biotechnologie végétale

Présenté par

Mme Mansouri LM

Maître assistante A

Année Universitaire

2019 - 2020

1. Coloration des endomycorhizes

1.1. 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.

1.2. Matériel

Une plante quelconque, excepté une Brassicacée ou une Chénopodiacée (groupes non-symbiotiques, avec des poils absorbants seulement). Eviter surtout les sols très riches, où les plantes se nourrissent 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 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.

1.3. 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.

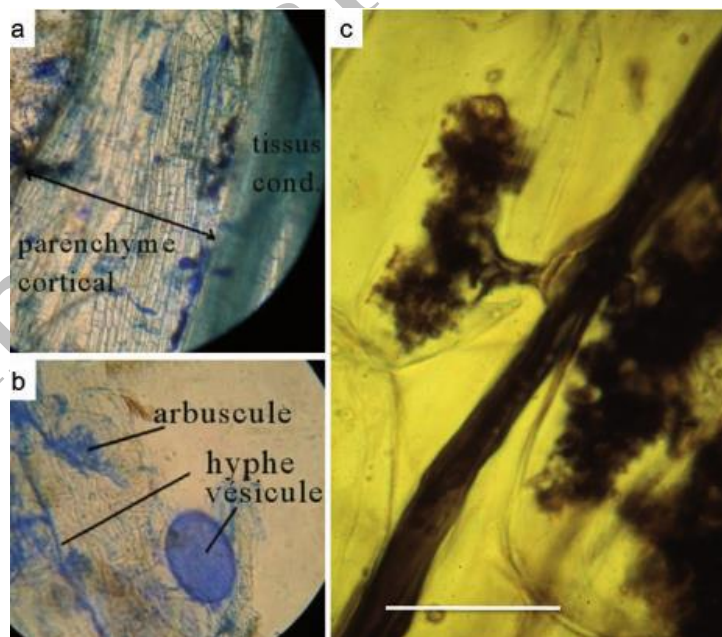
5. Pour une observation directe, monter dans l'eau. Si on souhaite observer plus tard ou conserver les lames, monter dans le lactoglycérol. Si c'est trop épais, écraser doucement avec le dos d'un crayon papier en bois, voire donner un coup sec

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.

1.4. 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).

2. Observation de spores de Glomérormycètes

2.1. 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.

2.2. Matériel

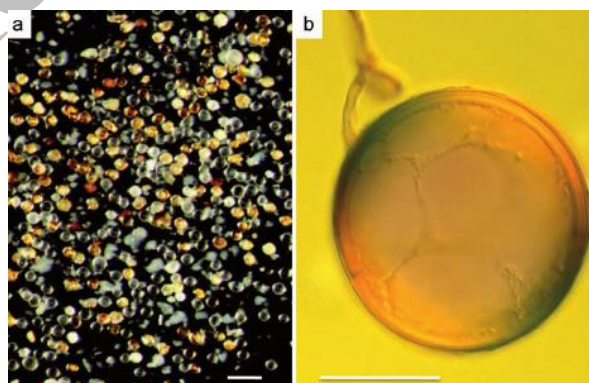
- du sol non traité : ni engrais (voir plus haut), ni pesticides...
- des tamis fins à maille de 250, 150, et 50 μm .
- des boîtes de Pétri pour récupérer les fractions d'intérêt.

2.3. 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, vue la taille des spores, ne pas écraser la lame pour ne pas les détruire).

2.4. 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 Glomérormycètes

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).

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).

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