Article de recherche

Sur la mycorhization contrôlée de semis d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehnardt par *Gigaspora margarita* Becker & Hall

K. Boudarga et J. Dexheimer

Laboratoire de biologie des ligneux, J.E. CNR 034613, Université de Nancy I, BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex, France

(reçu le 12-6-1988, accepté le 20-9-1988)

Résumé — Les auteurs présentent une méthode d'endomycorhization contrôlée de jeunes semis d'*Eucalyptus camaldulensis* par *Gigaspora margarita*. La vérification en microscopie photonique et électronique des mycorhizes obtenues n'a pas fait apparaître des différences significatives avec les mycorhizes naturelles. La technique est donc précise et fiable. Bien que limitée pour la production de grandes quantités de plantes mycorhizées, elle est néanmoins intéressante pour des études théoriques.

mycorhization contrôlée – mycorhizes à vésicules et arbuscules – eucalyptus – *Gigaspora* – morphologie – ultrastructure

Summary — Controlled mycorrhization of *Eucalyptus camaldulensis* seedlings by *Gigaspora margarita* Becker & Hall. The authors present a method for the controlled endomycorrhization of young *Eucalyptus camaldulensis* seedlings by *Gigaspora margarita*. The host plant seeds were disinfected and endophyte spores were superficially disinfected and allowed to germinate separately. The plantlets and spore with a germination tube were confronted in the symbiosis medium (Crush et Hay, 1977) in a large Petri dish (Fig. 1). After 36 days, light and electron microscopic examination of the mycorrhizas obtained failed to show any significant differences with natural mycorrhizas. The internal cortical cells infected by the endophyte presented a dense cytoplasm surrounding a well-developed arbuscule, the host plasmalemma delimiting the interface was never broken (Fig. 2). This method is therefore precise and reliable. Although of limited use for the production of large quantities of mycorrhized plants, it may be useful for theoretical studies.

controlled mycorrhization – vesicular arbuscular mycorrhizas – eucalyptus – *Gigaspora* – morphology – fine structure

Introduction

Suivant les espèces, les mycorhizes caractéristiques sont soit des ectomycorhizes, soit des endomycorhizes et beau-

coup plus rarement des ectendomycorhizes. A ce point de vue, le genre *Eucalyptus* est particulier, puisque divers auteurs (Khan, 1978; Malajczuk, 1981; Lapeyrie et Chilvers, 1985) ont montré

qu'à l'état juvénile, les mycorhizes typiques sont des endomycorhizes à vésicules et arbuscules, ce type mycorhizien étant ensuite progressivement remplacé par des ectomycorhizes.

En plus d'un effet positif des mycorhizes sur le développement de la plante hôte, il a été montré, dans un certain nombre de cas, (Ross, 1972; Chou et Schmitthenner, 1974; Schenck *et al.*, 1975b; Matare et Hattingh, 1978; Bartchi, 1979; Bartchi *et al.*, 1981) que la plante hôte bénéficie d'une protection vis-à-vis des agents pathogènes du sol.

L'utilisation pratique de techniques de mycorhization contrôlée apparaît donc comme particulièrement intéressante, mais la manipulation des champignons mycorhiziens et la production de grandes quantités d'inoculum est plus ou moins aisée. La plupart des espèces de champignons formant des ectomycorhizes et certaines espèces de champignons à endomycorhizes (endomycorhizes éricoïdes : *Pezizella ericae*, Pearson et Read, 1973; Bonfante-Fasolo et Gianinazzi-Pearson, 1982; endomycorhizes à pelotons des orchidées : *Rhizoctonia sp.*, Serrigny 1985) se cultivent sur des milieux artificiels, et la réalisation de symbioses contrôlées est relativement facile. Au contraire, la culture sur un milieu synthétique des champignons responsables des endomycorhizes à vésicules et arbuscules (endogonacées) n'est pas encore réalisée, malgré divers essais d'obtention de quantités appréciables d'inoculum.

Nous mentionnerons les tentatives d'isolement du mycélium à partir de racines, mais les hyphes ainsi isolées ne se sont jamais associées à des plantes hôtes (Jones, 1924; Magrou, 1946 *in* Strullu, 1986). Strullu (1986) désinfecte superficiellement des mycorhizes et les met en culture. Le mycélium qui en sort et s'étale sur le milieu a été prélevé et a infecté des plantes hôtes. Dans une autre

approche, ce même auteur (1987) isole des vésicules du champignon et produit en conditions axéniques des hyphes capables de former des mycorhizes. Mais la technique la plus couramment employée (MacDonald, 1981; Powell, 1976; Pons *et al.*, 1982, 1983; Pons, 1984; Haas et Krikun, 1985; Hepper, 1981; Saint-John *et al.*, 1981; Bartschi, 1979; Mosse, 1962) consiste à isoler des spores, les désinfecter superficiellement, les faire germer sur un milieu aseptique et à confronter les germinations avec les racines de la plante hôte.

Le but du présent travail est de présenter une technique d'endomycorhization contrôlée de plantes juvéniles d'*Eucalyptus camaldulensis*. Les mycorhizes obtenues ont été vérifiées par des études cytologiques en microscopie électronique.

Matériels et Méthodes

Plante hôte

Nous avons utilisé des graines d'*Eucalyptus camaldulensis* en provenance de Lake Albacutya qui nous ont été fournies par la Station de recherches forestières de Rabat (Maroc). Les graines sont désinfectées par un passage de 20 min dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 5% suivi de trois rinçages de 5 min chacun par l'eau distillée stérile. Puis, elles sont mises à germer dans des boîtes de Pétri (7 à 8 graines par boîte) contenant un milieu gélosé (Agar 1%, 2% de saccharose).

Endophyte

Le *Gigaspora margarita* nous a été donné par M. S. Gianinazzi du Laboratoire de physiopathologie végétale du centre de l'INRA de Dijon. La souche fongique était associée à des oignons cultivés en pots remplis de sol prélevé dans le domaine d'Epoisses (INRA). L'isole-

Fig. 1. Schéma de la technique de mycorhization *in vitro* d'*Eucalyptus camaldulensis* par *Gigaspora margarita*. 1. Graines d'*Eucalyptus camaldulensis*; 2. désinfection des graines; 3. germination en milieu aseptique; 1'. tamisage de la terre contenant des hyphes et des spores de *Gigaspora margarita*; 2'. désinfection des spores; 3'. germination en milieu aseptique; 4. synthèse mycorhizienne en boîte de Pétri.

ment des spores se fait par tamisage du sol selon la méthode proposée par Gerdemann et Nicolson (1963). Ces spores présentent une

taille importante, ce qui facilite les manipulations. Elles sont recueillies dans les fractions de 350 et 100 μm , puis désinfectées superficiellement.

ment par un passage dans une solution de 2% de chloramine T et 40 mg de streptomycine durant 20 min (Bartschi, 1979). Après 3 rinçages dans de l'eau distillée stérile, elles sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri sur de l'eau gélosée à 1% (5 ou 6 spores par boîte) stérilisée par un passage à l'autoclave pendant 10 min à 121°. Le pH est ajusté avant autoclavage à 6,8.

Reconstruction de l'association en conditions contrôlées

L'association est réalisée, en grandes boîtes de Pétri, sur le milieu de Crush et Hay (1977, *in* Pons, 1984) et dont la composition est la suivante :

NH ₄ NO ₃	0,080	g/l
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0,159	g/l
KNO ₃	0,064	g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,039	g/l
Na ₂ SO ₄ , 10H ₂ O	0,086	g/l
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,00001	g/l
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,0004	g/l
H ₃ BO ₃	0,00035	g/l
KCl	0,0236	g/l
KH ₂ PO ₄	0,0001	g/l
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	0,000045	g/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,017	g/l
Na ₂ EDTA	0,022	g/l
Difco-Bacto-Agar	15	g/l

Nous avons ajouté à ce milieu 5 g/l de charbon actif. Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution normale d'HCl. Les graines de *Eucalyptus* et les spores de *Gigaspora* qui ont germé sont prélevées aseptiquement et transférées sur le milieu de symbiose. Les spores sont placées à proximité des racines secondaires qui sont émises par le pivot des jeunes plantes (Fig. 1). Les boîtes de Pétri sont fermées par un ruban adhésif, et disposées en position inclinée (30° par rapport à la verticale) sous une rampe lumineuse (12 tubes Sylvania GroLux de 30 watts) réglée en jours de 12 h.

Techniques d'observation

Microscopie photonique

Après 36 jours de culture, et pour contrôler l'installation de la mycorhize, nous avons prélevé des racines et pratiqué une coloration selon la méthode de Phillips et Hayman (1970).

Observation de coupes semi-minces

Les coupes semi-minces sont réalisées à partir d'objets préparés pour la microscopie électronique. Elles sont colorées par le bleu de toluidine à pH alcalin. Leur observation permet d'évaluer le nombre et l'état des cellules du cortex racinaire renfermant l'endophyte.

Microscopie électronique

Les fragments de racine ont été fixés par le glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon phosphate à pH 7,2 pendant 6 à 8 h à la température de la glace fondante; les objets sont ensuite rincés par le même tampon, puis postfixés à l'osmium (2%, 1 h), déshydratés par l'acétone et inclus dans l'épon (Dexheimer *et al.*, 1979; Boudarga et Dexheimer, 1988).

Les coupes minces sont faites sur ultramicrotome à l'aide d'un couteau de diamant. Elles sont recueillies sur des grilles en cuivre puis colorées par le citrate de plomb et l'acétate d'uranyle pour des observations classiques.

Résultats

Nous avons régulièrement suivi, par des observations à la loupe binoculaire, à travers le couvercle des boîtes de Pétri, maintenues fermées, le développement du système racinaire des jeunes plantes et la croissance des hyphes issues des spores de *Gigaspora*. Après 36 jours de culture sur le milieu de mycorhization, les racines secondaires présentent un accroissement notable (Fig. 2.2). De même, les hyphes issues des spores sur lesquelles sont apparues des vésicules groupées (Fig. 2.3 et 2.4) se sont considé-

Fig. 2. 1. Germination d'une spore de *Gigaspora margarita*. Les hyphes germinatives présentent d'abord une croissance rectiligne puis sinusoïdale (flèche), Gx 33; 2. Dispositif de mycorhization contrôlée. Les spores sont déposées à proximité des racines secondaires (flèches) de la jeune plante d'*Eucalyptus*; 3. Contact des hyphes de *Gigaspora margarita* avec les racines d'eucalyptus (flèches). Formation de vésicules sur les hyphes germinatives, Gx 34; 4. Contact entre une hyphe de *Gigaspora margarita* et un poil absorbant dilaté (flèche), Gx 55.

Abréviations : sp : spore; hy : hyphe germinative; v : vésicules; hi : hyphe intercellulaire; cc : cylindre central; E : endophyte; p : plasmalemme de la cellule hôte; P : paroi de la cellule hôte; PH : petite hyphe; GH : grosse hyphe. Sur les micrographies électroniques (Pl. II, figs. 4 et 5), le trait noir représente 1 μ m.

Fig. 3. 1. Vue d'ensemble d'une racine infectée par l'endophyte. Coloration par le bleu Trypan et écrasement entre lame et lamelle. Nombreuses hyphes intercellulaires (flèches). L'apex est indemne de champignon, Gx 224; 2. Formation d'un peloton (flèche), Gx 700; 3. Coupe semi-mince montrant des arbuscules dans les cellules internes de la racine, Gx 1400; 4. Micrographie électronique d'une cellule hôte du cortex interne de la racine renfermant un arbuscule. Les sections de l'endophyte présentent des diamètres variés correspondant aux grosses et petites branches. Le cytoplasme occupe la quasi totalité du volume cellulaire, Gx 3900; 5. Branche de l'arbuscule. Le plasmalemme de la cellule hôte entoure chaque section arbusculaire empêchant ainsi le contact direct entre l'endophyte et le cytoplasme de la cellule hôte. Gx 45000.

Pour les abréviations, voir légende de la Figure 2. Figs. 3.1, 3.2, 3.3 : microscopie photonique; Figs. 1.4 et 1.5 : microscopie électronique.

blement allongées (Fig. 2.1) et semblent parfois entrer en contact avec les racines secondaires ou même la racine principale soit au niveau du cortex (Fig. 2.3), soit par l'intermédiaire de poils absorbants qui peuvent être très abondants sur certaines racines (Fig. 3.4).

Toutefois, comme les hyphes sont ténues, il nous est très difficile de préciser si elles sont en contact avec les racines ou si elles se trouvent au-dessus ou au-dessous de ces dernières. Nous avons donc prélevé des racines que nous avons coloré par le bleu trypan afin de préciser nos observations.

Nous avons ainsi pu voir que les hyphes pénètrent bien dans le cortex racinaire et y établissent un réseau lâche intercellulaire (Fig. 3.1). Dans les cellules corticales superficielles, les hyphes forment seulement des pelotons (Fig. 3.2). Dans les cellules profondes, à proximité de l'endoderme, elles établissent par contre, des arbuscules bien développés. La zone apicale des racines est toujours indemne de champignon (Fig. 3.1). L'examen des coupes semi-minces confirme l'existence de cellules infectées par l'endophyte, montrant un cytoplasme dense, bien contrasté et de nombreuses sections d'hyphes (Fig. 3.3).

Par des observations en microscopie électronique, nous avons vérifié l'organisation fine des mycorhizes obtenues dans ces conditions. Les cellules corticales externes ne renferment que des pelotons de grosses hyphes. Les arbuscules ne sont observés que dans les cellules profondes. Les cellules infectées par l'endophyte (Fig. 3.4.), et renfermant un arbuscule vivant montrent un cytoplasme dense, peu vacuolisé, riche en mitochondries et travées du réticulum endoplasmique. Les ribosomes sont très abondants. Les très nombreuses sections des hyphes de l'arbuscule sont toujours entou-

rées par la membrane plasmalemmique de l'hôte (Fig. 3.5).

Lorsque la cellule renferme un arbuscule mort, les hyphes, réduites à leur paroi, sont agglomérées et enrobées dans du matériel polysaccharidique.

Discussion et conclusion

La technique de mycorhization contrôlée que nous avons utilisée est directement inspirée de celle mise au point par Pons (1984) et qui a été essayée, par cet auteur, sur des semis de *Trifolium pratense*, de *Lolium perenne* et sur des vitroplants de merisier (*Prunus avium*) et de poirier (*Pyrus sp.*).

Cette technique confronte les partenaires de la symbiose dans un milieu confiné (boîte de Pétri) qui limite considérablement le développement des plantes. En fait, elle n'est utilisable qu'avec des espèces possédant des germinations de petite taille. A ce point de vue, l'*Eucalyptus camaldulensis* représente un matériel parfaitement adapté, puisque les graines qui sont minuscules, produisent de petites plantes qui développent rapidement un chevelu de très fines racines. Les contrôles cytologiques ont confirmé la validité de la méthode pour l'*Eucalyptus camaldulensis*.

En microscopie photonique, nous avons observé que les hyphes issues des spores de *Gigaspora margarita* infectaient les racines secondaires et parfois même la racine principale, et formaient des pelotons dans les couches superficielles et des arbuscules dans les couches situées à proximité du cylindre central. Cette morphologie d'une mycorhize VA est tout à fait identique à celle que nous avons décrite dans des mycorhizes de la même espèce obtenues en conditions semi-naturelles (Boudarga et Dexheimer, 1988).

Nous avons aussi vérifié, par des observations ultrastructurales, que l'organisation fine de ces mycorhizes ne diffère pas de celle que nous avons décrite dans des mycorhizes semi-naturelles de la même espèce (Boudarga et Dexheimer, 1988). En particulier, les cellules qui renferment un arbuscule montrent de très nombreuses sections du champignon, qui est toujours isolé du cytoplasme de la cellule hôte par du plasmalemme.

La persistance de l'intégrité de la membrane plasmalemmique dans les mycorhizes que nous avons obtenue est une indication de la réalisation de mycorhizes fonctionnelles. En effet, Bonfante-Fasolo *et al.* (1984) ont montré qu'au cours de la confrontation de partenaires incompatibles, la membrane plasmalemmique était rompue et que la cellule infectée se détruisait rapidement.

Cette technique apparaît donc comme précise et fiable pour réaliser des mycorhizations en conditions contrôlées de l'*Eucalyptus camaldulensis*. Ces conclusions sont tout à fait en accord avec celles de Pons (1984) pour d'autres espèces.

Toutefois, nous remarquerons que, compte tenu des manipulations à effectuer, il est difficilement envisageable de l'utiliser pour produire des plants mycorhizés à grande échelle.

Malgré cette limitation, la technique est néanmoins intéressante car elle permet d'obtenir un modèle de mycorhize, facilement manipulable pour des études théoriques. En particulier, nous envisageons d'étudier, grâce à cette méthode, d'une part, l'aptitude à la mycorhization de plantes produites par vitropropagation, d'autre part, la dynamique de la succession des types mycorhiziens (endomycorhizes, puis ectomycorhizes) dans les jeunes plantes d'eucalyptus.

Références

- Bartschi H. (1979) *Influence des Endogonaceae endomycorhiziennes sur la nutrition, la croissance, le développement et la résistance des plantes aux maladies. Etude conduite avec Phaseolus vulgaris L., Tagetes patulus L., Chamaecyparis lawsoniana (A. Murray) Parl. et Vitis vinifera L.* Thèse de III^e cycle, Université de Lyon I
- Bartschi H., Gianinazzi-Pearson V. & Vegh I. (1981) Vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and root disease (*Phytophthora cinnamomi*) development in *Chamaecyparis lawsoniana*. *Phytopathol. Z.* 102, 213-218
- Bonfante-Fasolo P. & Gianinazzi-Pearson V. (1982) Ultrastructural aspects of endomycorhizas in the Ericaceae. III. Morphology of the dissociated symbionts and modifications occurring during their reassociation in axenic culture. *Plant Sci. Lett.* 22, 13-21
- Bonfante-Fasolo P., Gianinazzi-Pearson V. & Martinengo L. (1984) Ultrastructural aspects of endomycorhiza in the Ericaceae. IV. Comparison of infection by *Pezizella ericae* in host and non host-plants. *N. Phytol.* 98, 329-333
- Boudarga K. & Dexheimer J. (1988) Etude ultrastructurale des endomycorhizes à vésicules et arbuscules de jeunes plants d'*Eucalyptus camaldulensis* (Dehnhardt) (Myrtacées). *Bull. Soc. Bot. Fr.* 135, 111-121
- Chou L.G. & Schmitthenner A.F. (1974) Effect of *Rhizobium japonicum* and *Endogone mosseae* on soybean root caused by *Pythium ultimum* and *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Dis. Rep.* 58, 221-225
- Crush J.R. & Hay M.J.M. (1981) A technique for growing mycorrhizal clover in solution culture. *N.Z.J. Agric. Res.* 24, 371-372
- Dexheimer J., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. (1979) Ultrastructural cytochemistry of the host-fungus interfaces in the endomycorhizal association *Glomus mosseae/Allium cepa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 191-206
- Gerdemann J.W. & Nicolson T.H. (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 234-235

- Haas J.H. & Krikun J. (1985) Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response. *New Phytol.* 100, 613-621
- Hepper C. (1981) Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytol.* 88, 641-647
- Khan A.G. (1978) Vesicular arbuscular mycorrhizas in plants colonizing black wastes from bituminous coal mining in the Illawarra region of New South Wales. *New Phytol.* 81, 53-63
- Lapeyrie F.F. & Chilvers G.A. (1985) An endomycorrhiza-ectomycorrhiza succession associated with enhanced growth of *Eucalyptus dumosa* seedlings planted in a calcareous soil. *New Phytol.* 100, 93-104.
- MacDonald R.M. (1981) Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol.* 89, 87-93.
- Malajczuk N. (1981) Presence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in *Eucalyptus* spp. and *Acacia* sp. and their absence in *Banksia* sp. after inoculation with *Glomus fasciculatus*. *New Phytol.* 87, 567-572.
- Matare R. & Hattingh M.J. (1978) Effect of mycorrhizal status of Avocado seedlings on root rot caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Soil* 49, 433-435
- Mosse B. (1962) The establishment of Vesicular-arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. *J. gen. Microbiol.* 27, 509-520
- Pearson V. & Read D.J. (1973) The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. I. Isolation of the endophyte and synthesis of mycorrhizas in aseptic culture. *New Phytol.* 72, 371-379
- Phillips J.M. & Hayman D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and VA mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 158-161
- Pons F. (1984) *L'endomycorhization VA in vitro de quelques espèces herbacées et ligneuses; aspects ultrastructuraux de l'association*. Thèse de III^e cycle, université de Dijon
- Pons F., Gianinazzi-Pearson V. & Gianinazzi S. (1982) Synthèse *in vitro* des endomycorhizes éricoides et VA : complément à la vitropagation. *Colloq. INRA* 13, 345-349
- Pons F., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S. & Navatel J.-C. (1983) Studies of VA mycorrhizae *in vitro* : mycorrhizal synthesis of axenally propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. *Plant Soil* 71, 217-221
- Powell C.L. (1976) Development of mycorrhizal infections from endogone spores and infected root segments. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66, 439-445
- Ross J.P. (1972) Influence of *Endogone* mycorrhiza on *Phytophthora* root of soybean. *Phytopathology* 62, 896-897
- Schenck N.C., Kinloch R.A. & Dickson D.W. (1975) Interaction of endomycorrhizal fungi and root-knot nematode on soybean. In : *Endomycorrhizas* (F.E. Sanders, B. Mosse, P.B. Tinker, eds.) Academic Press, London, New York, pp. 605-617
- Serrigny J. (1985) *Synthese mycorrhizienne in vitro. Etude cytologique comparée entre deux mycorhizes naturelles et artificielles et leur champignon symbiote isolé*. Thèse de III^e cycle, université de Nancy I
- St'John T.V., Hays R.I. & Reid C.P.P. (1981) A new method for producing pure vesicular-arbuscular mycorrhizal-host cultures without specialized media. *New Phytol.* 89, 81-86
- Strullu D.G. & Romand C. (1986) Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques. *C.R. Acad. Sc. Paris* 303, 245-250
- Strullu D.G. & Romand C. (1987) Culture axénique de vésicules isolées à partir d'endomycorhizes et de ré-association *in vitro* à des racines de tomate. *C.R. Acad. Sci. Paris* 305, 15-19