

## Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). III. Les rhizomorphes

A Prévost, JC Pargney\*

Laboratoire de biologie forestière, faculté des sciences, université Henri-Poincaré Nancy-I,  
BP 239, 54506 Vandœuvre cedex, France

(Reçu le 2 mai 1995 ; accepté le 21 août 1995)

**Summary – Comparison of natural ectomycorrhizae between beech (*Fagus sylvatica*) and two fungi (*Lactarius blennius* var *viridis* and *Lactarius subdulcis*). III. Rhizomorphs.** *Lactarius blennius* var *viridis* and *Lactarius subdulcis* form smooth ectomycorrhizas with beech roots. Rhizomorphs were observed on both mycorrhizas. Different hyphae were present in rhizomorphs: dead small hyphae with very thick electron-dense walls and alive hyphae showing relatively large diameter and walls less thick than the others. These morphological differences could be in relationship with the functional activity of hyphae: the alive hyphae revealed an accumulation of glycogen, while the dead hyphae facilitated and canalized water and nutrients brought to the mycorrhizas.

**rhizomorphs / ectomycorrhizas / *Lactarius* / ultrastructure**

**Résumé –** *Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis* forment avec les racines de hêtre des ectomycorhizes lisses. Les deux types de mycorhizes portent des rhizomorphes constitués de différentes hyphes : de petites hyphes mortes à parois très épaisses et denses aux électrons, et des hyphes plus grosses, vivantes, à parois moins épaisses. Ces différences morphologiques doivent correspondre à des fonctions différentes de ces deux types d'hyphes : les hyphes vivantes sont impliquées dans l'accumulation de réserves de glycogène ; les hyphes mortes contribuent à favoriser et canaliser les apports d'eau et de nutriments à la mycorhize.

**rhizomorphes / ectomycorhize / *Lactarius* / ultrastructure**

### INTRODUCTION

Dans les associations ectomycorhiziennes, les manteaux fongiques ont un double rôle : un rôle protecteur vis-à-vis des cellules racinaires de la plante hôte et un rôle d'échanges avec la mycorhizosphère. Les échanges entre la mycorhize et son environnement peuvent être assurés par

les cordons mycéliens et les rhizomorphes qui se différencient à partir du manteau. Les rhizomorphes sont plus ou moins abondants selon les types de mycorhizes et donc selon le partenaire fongique.

Dans le présent travail, nous nous proposons de décrire et de comparer la structure des rhizo-

\*Correspondance et tirés à part.

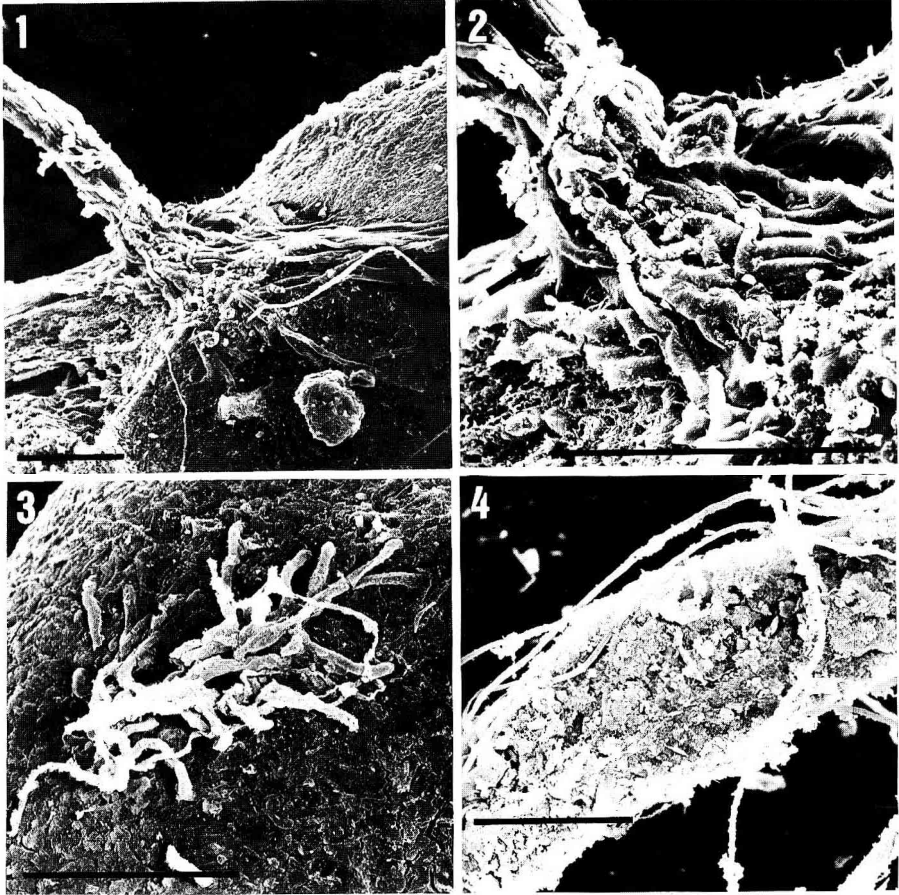
morphes qui se développent à la surface de deux ectomycorhizes naturelles de lactaires précédemment étudiées (Prévost et Pargney, 1995 ; Pargney et Prévost, 1996) et d'essayer, à partir de cette structure, d'en expliquer le fonctionnement.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

La description du matériel prélevé, les techniques de microscopie photoniques, électroni-

ques à balayage et à transmission et les techniques de coloration ont été mentionnées dans les précédentes publications (Prévost et Pargney, 1995 ; Pargney et Prévost, 1996).

L'étude des rhizomorphes est effectuée grâce aux trois techniques. En microscopie photonique, les colorations par le bleu de toluidine et le réactif de Lugol ont été utilisées. En microscopie à transmission, les coupes ont été contras-



**Figs 1–4.** Aspect des rhizomorphes en microscopie électronique à balayage chez *L. blennius* (1–3) et *L. subdulcis* (4). **1.** Départ d'un rhizomorphe (x 400). **2.** Base du rhizomorphe où les hyphes se réunissent et s'enchevêtrent : certaines sont anastomosées (flèche) (x 1 200). **3.** Ensemble d'hyphes à la surface du manteau s'agréant pour former un début de rhizomorphe (x 800). **4.** Portion de rhizomorphe montrant sa structure compacte (x 600). Les traits correspondent à 50  $\mu\text{m}$ .

tées soit par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb, soit par le test PATAg.

## RÉSULTATS

### Étude morphologique

L'ectomycorhize à *L. blennius* var *viridis* porte des rhizomorphes de couleur orangée comme la mycorhize, et qui prennent naissance à la base des ramifications de la mycorhize. La microscopie électronique à balayage montre qu'ils sont formés de la réunion de nombreuses hyphes issues du manteau (fig 1). Celles-ci sont particulièrement bien visibles à la base du rhizomorphe (fig 2). Elles émergent du manteau, rampent à sa surface puis se réunissent en faisceau. Certaines d'entre elles sont anastomosées (fig 2). Des débuts de formation de rhizomorphes ont pu être observés (fig 3).

L'ectomycorhize à *L. subdulcis* présente également des rhizomorphes de même couleur que la mycorhize (jaune orangé). Des groupes d'hyphes émanant du manteau sont à l'origine de rhizomorphes. Ceux-ci ont une structure compacte ; leurs hyphes sont agglomérées et liées à des fragments de terre (fig 4).

### Étude en microscopie photonique

Les rhizomorphes de l'ectomycorhize à *L. blennius* var *viridis* sont constitués de groupements d'hyphes à parois plus ou moins épaisses ; des hyphes de petite section et à parois foncées en entourent d'autres plus grosses à parois claires (fig 5). Après coloration par le bleu de toluidine, les laticifères qui y sont associés ont un contenu cellulaire très dense (fig 5). Le latex est coloré en brun par le réactif de Lugol. Sur les sections longitudinales, les laticifères apparaissent septés et ramifiés (fig 6).

Les rhizomorphes de l'ectomycorhize à *L. subdulcis* montrent des hyphes de diamètre variable dont les parois présentent une même épaisseur et une même coloration après utilisation du bleu de toluidine (fig 7). L'utilisation du réactif de Lugol met en évidence le latex des laticifères des rhizomorphes (fig 8).

### Étude en microscopie électronique à transmission

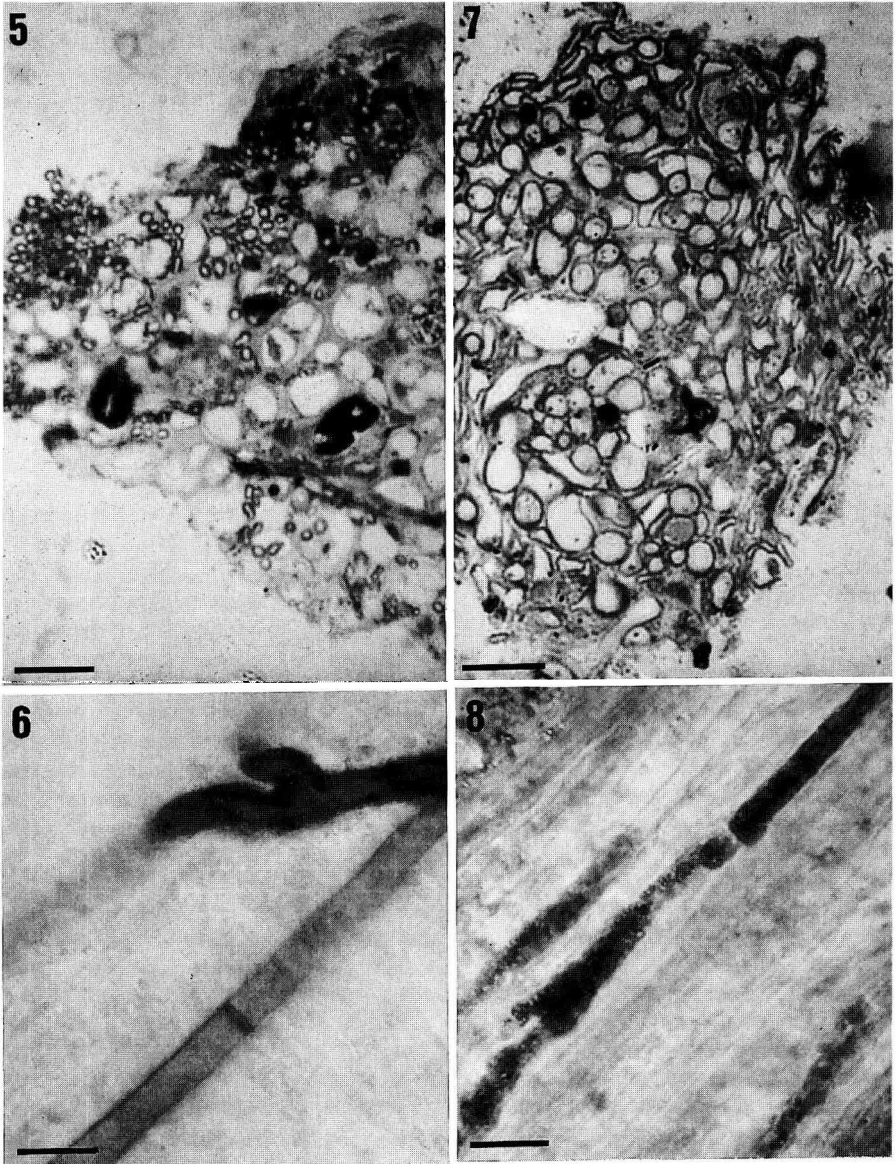
L'ectomycorhize à *L. blennius* var *viridis* montre des rhizomorphes constitués de deux types d'hyphes qui se différencient par leur section, leur paroi et leur contenu (fig 9).

Les hyphes les plus petites ont des parois très épaisses et très denses aux électrons (figs 10 et 11). Elles sont en général dépourvues de tout contenu cellulaire, à l'exception de quelques restes de cytoplasme (fig 10). Elles occupent dans le rhizomorphe une position généralement périphérique (figs 9 et 11).

Les hyphes de grande section sont généralement vivantes (fig 10). Leurs parois sont peu compactes et souvent délaminiées, elles montrent un contraste très variable. Leur cytoplasme renferme peu d'organites, des vacuoles et des noyaux. Ces hyphes sont localisées au centre du rhizomorphe et jamais à la périphérie.

Les hyphes du rhizomorphe sont liées entre elles par un ciment lâche, très clair aux électrons, dans lequel des débris de terre et des bactéries sont présents. Des bactéries de section irrégulière colonisent souvent la surface du rhizomorphe (fig 11).

L'ectomycorhize à *L. subdulcis* porte des rhizomorphes formés d'hyphes à parois très épaisses, plus ou moins denses aux électrons (fig 12). Des hyphes à parois claires que l'on trouve principalement au centre du rhizomorphe sont toujours entourées par des hyphes à parois denses (fig 13). Les hyphes à parois claires possèdent encore un cytoplasme, alors que celles à parois denses sont vides de tout contenu cellulaire. Elles sont étroitement accolées par un ciment qui apparaît plus marqué par le test PATAg que les parois adjacentes (fig 14). La réaction révèle également l'aspect stratifié des structures pariétales (figs 14 et 15) et la présence, dans les hyphes vivantes, de granules de glycogène essentiellement répartis le long du plasmalemme (fig 13). Des débris de terre peuvent avoir été piégés et sont encore présents entre les cellules fongiques et autour du rhizomorphe (fig 13). Des bactéries se sont développées à l'intérieur de nombreuses hyphes mortes (fig 13).



**Figs 5–8.** Coupes semi-minces des rhizomorphes de *L. blennius* (5–6) et *L. subdulcis* (7–8) **5.** Coupe transversale colorée au bleu de toluidine (x 1 500). **6.** Coupe longitudinale traitée par le réactif de Lugol révélant le latex dans les laticifères (x 1 500). **7.** Coupe transversale colorée au bleu de toluidine (x 1 500). **8.** Coupe longitudinale soumise au réactif de Lugol (x 1 500). Les traits correspondent à 10  $\mu$ m.

## DISCUSSION

Les rhizomorphes sont plus abondants dans la mycorhize de *L. subdulcis* que dans celle de *L. blennius*. Ils sont plus fréquemment observés au printemps, du mois d'avril au mois de juin. Comme l'ont remarqué aussi d'autres auteurs (Luppi et Gautero, 1967), ils sont toujours issus de la base d'une mycorhize.

Les structures des rhizomorphes des deux ectomycorhizes sont assez semblables : des hyphes dépourvues de tout contenu cytoplasmique, à parois très épaisses et très denses entourent des hyphes possédant un cytoplasme et des parois épaisses et moins opaques aux électrons. Plusieurs de ces unités réunies côte à côte forment le rhizomorphe. Toutefois cette structure apparaît plus lâche chez *L. blennius* que chez *L. subdulcis* où les hyphes sont étroitement accolées les unes aux autres.

L'ultrastructure des rhizomorphes d'autres mycorhizes a été peu étudiée jusqu'à présent. Cependant certains travaux montrent de nettes différences avec nos observations. Dans les rhizomorphes d'un ascomycète (*Sphaerostilbe repens*) produits en culture pure, Botton et Dexheimer (1977) décrivent une zone corticale formée d'hyphes étroitement unies les unes aux autres entourant une médulla de structure plus lâche et un centre lacuneux dépourvu d'hyphes. Les rhizomorphes de *Suillus bovinus* associé à *Pinus sylvestris* (Duddridge et al, 1980) présentent en revanche une structure plus proche de celle des rhizomorphes de lactaires, mais les grosses hyphes centrales sont dépourvues de cytoplasme alors que les hyphes périphériques en possèdent. Enfin, Ba (1990) décrit les cordons mycéliens d'un basidiomycète non identifié dont la structure, très similaire de celle que nous avons observée, montre des hyphes vides entourant des hyphes à cytoplasme bien différencié.

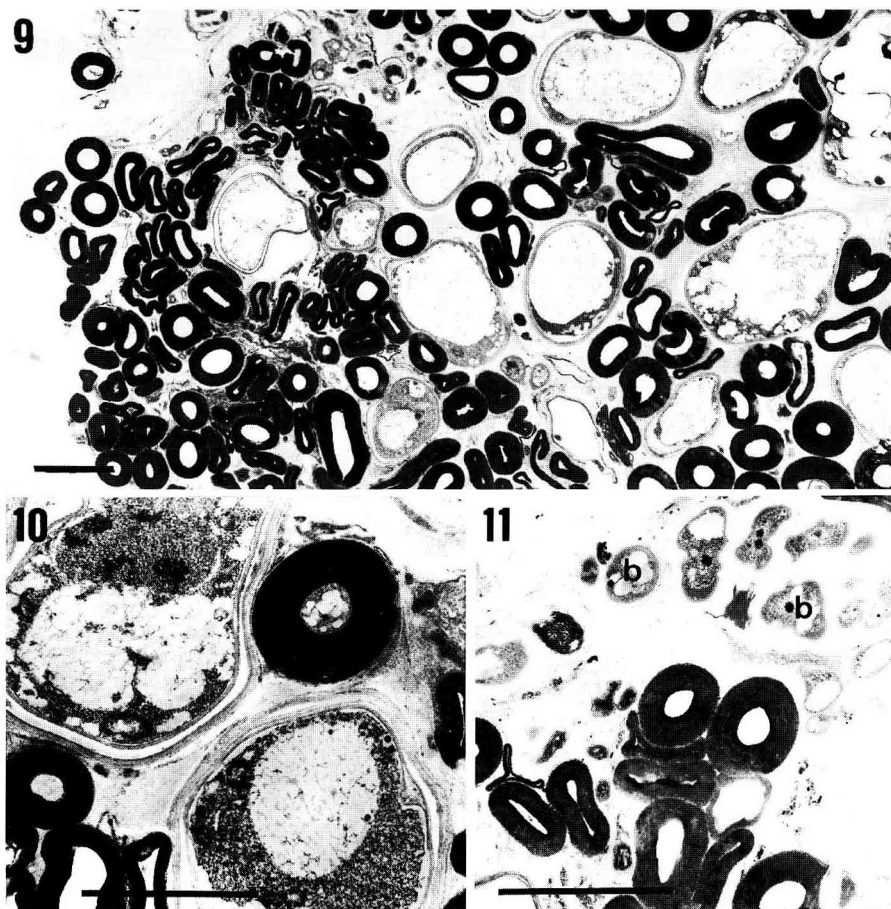
Les bactéries sont souvent observées au niveau des rhizomorphes : à la périphérie, entre les hyphes et dans les cavités fongiques dégénérées. Elles sont également signalées dans d'autres types de rhizomorphes (Ba, 1990). La diversité des sites occupés par les bactéries peut refléter la diversité des espèces bactériennes associées à ces structures. Les bactéries de surface ne sont certainement pas les mêmes que celles qui envahissent les hy-

phes mortes. Celles observées entre les hyphes ont pu être piégées lors de la formation du rhizomorphe, tout comme l'ont été les particules de sol présentes entre les hyphes.

Les échanges entre le sol et la plante hôte, par l'intermédiaire du champignon sont favorisés par la présence de rhizomorphes autour des ectomycorhizes. En augmentant considérablement la mycorrhizosphère, ils explorent le sol jusqu'à plusieurs centimètres de la racine et jouent un rôle actif dans le transport de l'eau (Duddridge et al, 1980 ; Brownlee et al, 1983 ; Read, 1984) et des phosphates (Duddridge et al, 1980). Toutefois, toutes les ectomycorhizes n'ont pas nécessairement un partenaire fongique qui différencie des rhizomorphes à la conquête du milieu environnant. Dans le cas des mycorhizes de lactaires, la production de rhizomorphes est relativement réduite, l'absorption s'effectuant directement à la surface du manteau. La couche mucilagineuse qui recouvre la mycorhize à *L. blennius* et les hyphes mortes des manteaux externes de *L. blennius* et *L. subdulcis* (Prévost et Pargney, 1995) représentent des entraves aux échanges directs. Toutefois, il a été montré expérimentalement que, dans des mycorhizes de truffe, les hyphes mortes du manteau externe ne perturbent pas les transferts (Pargney et Le Disquet, 1994).

Bien qu'en nombre réduit, les rhizomorphes des mycorhizes de lactaires contribuent à une meilleure exploration du milieu et à la quête des éléments minéraux du sol. Ils pourraient avoir également un rôle saprophyte comme ceux de *Cenococcum* (Ponge, 1990) et notamment ceux de la mycorhize de *L. blennius* qui se développent principalement dans la couche humifère riche en débris d'animaux et de végétaux en décomposition. Le caractère saprophyte des champignons ectomycorhiziens peut apparaître à certains moments de leur développement (Pargney, 1994).

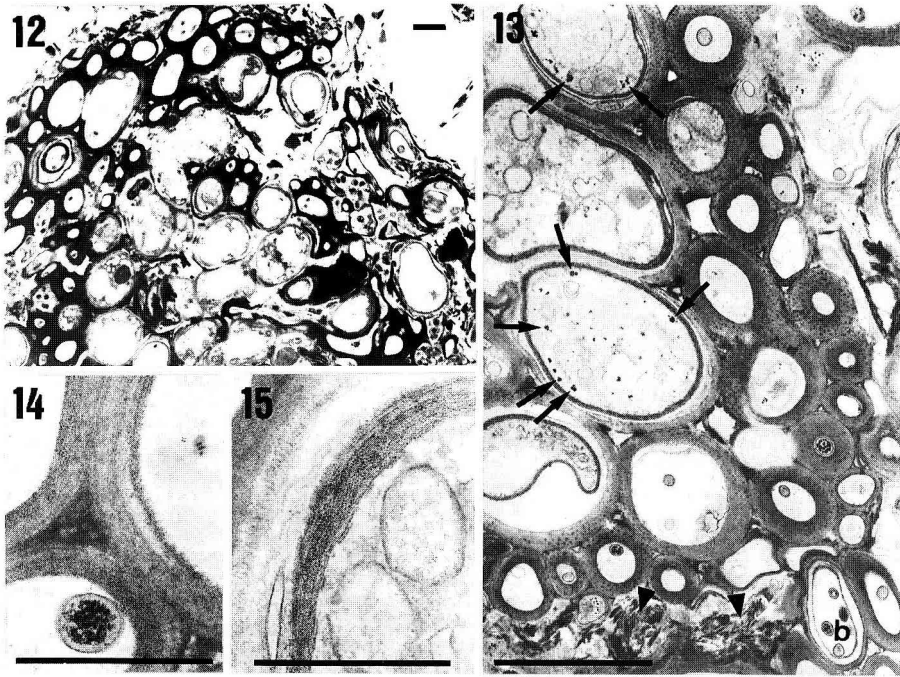
Les rhizomorphes participeraient ainsi à la nutrition carbonée de la plante hôte lorsque la photosynthèse ne suffit plus aux besoins nutritionnels (Martin, 1986). L'utilisation du test PATAg met en évidence la présence, dans les hyphes vivantes des rhizomorphes, de glycogène. Ce type de réserve est également abondant dans les



**Figs 9–11.** Rhizomorphe à *L. blennius* en microscopie électronique à transmission (contraste : acétate d'uranyl-citrate de plomb). **9.** Ensemble du rhizomorphe (x 7 000). **10.** Détail des hyphes du centre (x 15 000). **11.** Périphérie du rhizomorphe avec des bactéries (b) et des hyphes mortes à paroi épaisse (x 15 000). Les traits correspondent à 2  $\mu\text{m}$ .

autres hyphes vivantes des manteaux et des réseaux de Hartig des deux lactaires (Pargney et Prévost, 1996). Il correspond à une forme de stockage du matériel glucidique soit transféré de la plante hôte au champignon et qui s'accumule dans toutes les structures fongiques vivantes impliquées dans le fonctionnement de la mycorhize, soit d'origine exogène à la mycorhize et que le champignon puise par voie saprophytique.

En conclusion, les deux lactaires ont la capacité de différencier des structures très élaborées dont l'organisation est différente de celle des rhizomorphes d'autres champignons. Elles sont constituées de deux types d'hyphes dont la structure traduit des fonctions différentes. Les hyphes vivantes accumulent des réserves glucidiques. Les hyphes mortes, à parois très épaisses et très denses, sont plus aptes du fait de leur structure à assurer les transferts d'eau et de



**Figs 12–15.** Rhizomorphe à *L. subdulcis* contrasté par l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb (12) ou le test PATAg (13•15). **12.** Ensemble du rhizomorphe (x 3 000). **13.** Détail des hyphes du centre dont certaines renferment des bactéries (b) ; des granules de glycogène sont présents dans les hyphes vivantes (flèches) ; des débris de terre sont piégés entre les hyphes (têtes de flèches) (x 15 000). **14.** Interfaces entre hyphes mortes à parois épaissies ; l'une contient une bactérie (x 37 000). **15.** Paroi d'une hyphe vivante (x 37 000). Les traits correspondent à 2  $\mu\text{m}$  (figs 12•13) et 1  $\mu\text{m}$  (figs 14•15).

substances dissoutes. Duddridge et al (1980) ont comparé ce type d'hyphes aux vaisseaux du xylème des plantes supérieures. L'étude des transferts par l'intermédiaire des rhizomorphes devrait préciser cette diversité de fonction entre les deux types d'hyphes. Il est certain que l'abondance des cavités présentes dans les rhizomorphes (cavités des hyphes mortes et espaces interhyphaux) contribuent à canaliser et à favoriser les apports d'eau et de nutriments à la mycorhize.

## RÉFÉRENCES

- Ba AM (1990) Essais de mycorhization contrôlée entre quatre cèpes et quelques essences forestières : techniques culturales et aspects ultrastructuraux. Thèse d'université, université des sciences et techniques du Languedoc
- Botton B, Dexheimer J (1977) Ultrastructure des rhizomorphes du *Sphaerostilbe repens* B et Br. *Z Pflanzenphysiol* 85, 429-443
- Brownlee C, Duddridge JA, Malibari A, Read DJ (1983) The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways. *Plant Soil* 71, 433-444
- Duddridge JA, Malibari A, Read DJ (1980) Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special references to their role in water transport. *Nature* 287, 834-836
- Pargney JC (1994) Connaissances actuelles sur la structure, la biologie et l'écologie de la truffe. *Bull Acad Soc Lorraines Sci* 33, 159-173
- Pargney JC, Le Disquet I (1994) Approche, au niveau ultrastructural, du fonctionnement des ectomy-

- corhizes de truffe. *Acta Botanica Gallica* 141, 497-501
- Pargney JC, Prévost A (1996) Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). II. Caractérisation cytochimique des interfaces. *Ann Sci For* 53, 991-1004
- Ponge JF (1990) Ecological study of a forest humus by observing a small volume. I. Penetration of pine litter by mycorrhizal fungi. *Eur J For Path* 20, 290-303
- Prévost A, Pargney JC (1995) Comparaison des ectomycorhizes naturelles entre le hêtre (*Fagus sylvatica*) et deux lactaires (*Lactarius blennius* var *viridis* et *Lactarius subdulcis*). I. Caractéristiques macroscopiques et cytologiques. *Ann Sci For* 52, 131-146
- Read DJ (1984) The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots. In : *The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium* (DH Jennings, AD Rayner, eds), Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 215-240