

Détermination du potentiel infectieux des mycorhizes en sol agricole

Version 1.2 (2020)

Code	B-MIP		Secteurs d'utilisation possibles	
Secteur d'utilisation	Conseil de fumure	Grandes cultures et herbage		
		Légumes (en pleine terre et sous serre)		
		Viticulture, Arboriculture, Culture de baies, Plantes aromatiques et médicinales		
	Caractérisation du site		x	
	Appréciation des polluants			
	Analyse de fertilisants	Engrais de recyclage	Compost	
			Digestat solide	
			Digestat liquide	
		Engrais de ferme	Boue d'épuration	
			Fumier lisier	
Engrais minéraux				
Charbon végétal				
Recherche				
Méthodes correspondantes	Prélèvement de l'échantillon		B-M-PN	
	Préparation de l'échantillon		B-PAL	
	extraction			
	mesure		B-MIP	

Domaine de concentration	
Résultat	
Remarques sur méthodes équivalentes	
Sécurité / environnement	



1. Principe

Les champignons mycorhyziens du sol favorisent l'absorption des éléments fertilisants par la plante et jouent donc un rôle important dans sa fertilité. Leur activité est mesurée 60 jours après le semis d'une plante indicatrice dans un échantillon de sol frais : on observe le degré de mycorhization des racines de la plante indicatrice.

2. Exécution

Appareils et ustensiles:

- (A) Tamis pour terre, à mailles de 5mm
- (B) Tamis pour racines, à mailles de 2mm
- (C) Graines de poireau, *Allium porrum*, sorte « Dubouchet Selma »
- (D) Pots de croissance en plastique, ronds : hauteur = 6.5cm, diamètre = 9cm en haut, 6cm en bas (par ex. pots ronds Desch 9cm, art. No. 35252A, GVZ-Bolltec AG, Zürich)
- (E) Enceinte climatisée (phytotron). Réglage recommandé : jour/nuit = 16/8h, temp. 24/20°C, luminosité minimale $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$, luminosité recommandée $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$.
- (F) Microscope, grossissement 200 – 400 fois (oculaire 10x, objectifs 20x et 40x)
- (G) Bain-Marie (90°C)
- (H) Mini agitateur Vortex

Réactifs:

- (1) Eau déminéralisée (H_2O , conductivité électrique < 5uS/cm)
- (2) Hydroxyde de potassium 2,5% :
Peser 25g d'hydroxyde de potassium (KOH, $M=56.11 \text{ g/mol}$), dissoudre dans 1L d'eau (1),
- (3) Acide chlorhydrique 1% :
22.71 ml d'acide chlorhydrique pur (HCl 37%, $M=36.46 \text{ g/mol}$) dissoudre dans 1L d'eau (1).
- (4) Bleu Trypan 0.05% :
Verser successivement 0.5g de bleu Trypan, 500ml de glycérine et 50ml d'acide chlorhydrique 1% (3) dans un jaugé de 1L, dissoudre dans l'eau (1), mettre au trait.
- (5) Solution acide de glycérine :
Verser successivement 500ml de glycérine (glycérine exempte d'eau, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, $M=92.1 \text{ g/mol}$) et 50ml d'acide chlorhydrique 1% (3) dans un jaugé de 1L, dissoudre dans l'eau (1), mettre au trait.
- (6) Ethanol 70% :
Verser 729ml d'éthanol à 96% dans un jaugé de 1L, ajouter de l'eau (1), mettre au trait.

Mode opératoire:

Prélèvement :

Prélèvement et préparation des échantillons sont à effectuer selon les méthodes RM-ERL-2 (chap.2), B-M-PN et B-PAL, avec la modification suivante :

–Le semis de la plante indicatrice est à effectuer dans un délai inférieur ou égal à 5 jours après le prélèvement (stockage de l'échantillon à 4°C).

Biotest :

–Les échantillons (prélevés selon B-M-PN et préparés selon B-PAL) sont tamisés à 5mm (A) et bien mélangés. Après le passage de chaque échantillon de sol, tamis et récipient de réception

doivent être lavés et rincés à l'alcool (6), pour éviter toute contamination. La terre tamisée est transférée dans 10 pots (D) propres (répétitions).

- Des graines de plante indicatrice (C) sont déposées dans des boîtes de Petri et mises en contact avec de l'eau (1) pour permettre leur gonflement. Ensuite, 15 graines sont déposées à la surface de chacun des 10 pots, puis recouvertes de vermiculite. Les pots, reposant sur des fonds de boîtes de Petri, sont installés dans la chambre climatisée (E). Durant la phase de germination, la surface des pots est maintenue humide par arrosage, les pots sont recouverts avec les couvercles des boîtes de Petri pour éviter le dessèchement.
- L'arrosage est effectué avec de l'eau (1) : celle-ci est apportée dans les coupelles sous les pots. De nouveaux apports sont effectués à intervalles de 30 minutes, de manière à tenir compte de l'absorption d'eau par les terres et des besoins des plantes. Les terres ne doivent être ni trop sèches, ni trop humides. Après 2-3 semaines, on élimine une partie des plantes pour n'en conserver que 4 par pot.
- Enlever régulièrement les adventices indésirables, en prenant soin de les retirer avec leurs racines à l'aide d'une pincette. La pincette doit être nettoyée à l'alcool (6) avant de passer à un autre échantillon de sol.
- La récolte des plantes a lieu 60 jours après le semis. La plante entière est retirée avec soin, les racines sont lavées soigneusement au-dessus d'un tamis à mailles de 2mm (B). Ensuite, les racines sont séparées de leurs tiges, coupées en brins de 1.5cm de longueur et déposées dans un bassin rempli d'eau.

Coloration des racines :

- 50 brins de racines de 1.5cm par pot sont prélevés au hasard dans le bassin et colorés selon la méthode modifiée de Phillips et Hayman (1970). Si cette étape ne peut être effectuée immédiatement, on conserve les racines dans une solution d'alcool à 50%.
- Eclaircissage des racines : Les brins de racines sont transférés dans des tubes à essai à parois épaisses (h=9.5cm, diamètre=1.4cm) puis recouverts d'une solution de KOH (2). Les tubes sont ensuite brièvement agités sur le dispositif (H) puis installés sur un support et laissés 15 minutes dans le bain-Marie à 90°C (G).
- Rinçage : La solution de KOH est décantée (retenir les racines dans le tube à l'aide d'une spatule). Remplir ensuite les tubes d'eau, agiter et décanter à nouveau.
- Acidification des racines : Les racines éclaircies et rincées sont ensuite recouvertes de HCl (3). Après une brève agitation (H), la solution acide est décantée.
- Coloration des structures de mycorhize : Les racines acidifiées sont recouvertes d'une solution 0.05% de Trypan (4) et les tubes placés durant 30 minutes dans le bain-Marie à 90°C (G).
- Décoloration des structures racinaires : Pour accentuer le contraste, la solution colorante, est décantée et les brins de racines recouverts d'une solution acide de glycérine (5), puis laissée au repos (minimum 1 jour, maximum jusqu'à 1 année).

Détermination du degré d'infection :

- La détermination du degré d'infection est effectuée à l'aide du microscope (F) selon la méthode du réseau de mailles (McGonigle et al., 1990).
- 20 des 50 brins de racines colorées sont retirés de leur solution acide de glycérine (5) et disposés sur une lamelle porte-objet, perpendiculairement à son axe longitudinal. Eviter de choisir des brins ramifiés. Ils sont ensuite recouverts d'un verre (40x22mm) et pressés légèrement.
- L'observateur balaie ensuite 2.5 fois les 20 racines, en directions parallèles à l'axe longitudinal du porte-objet, sous un grossissement de 200x. Cette opération place ainsi sous ses yeux 50 rencontres successives avec une racine.
- Dès qu'une racine apparaît dans le champ de l'observateur, son orientation dans le sens vertical de la grille de l'oculaire est vérifiée, au besoin redressée, puis la totalité de la section horizontale de la racine, au niveau du transect choisi, est examinée quant à la présence d'hyphes, d'arbuscules et de vésicules.
- En fin d'observation, on a obtenu 50 réponses oui/non au critère de présence de chacun des trois types recherchés. L'exemple ci-dessous facilite la compréhension :

Site racinaire No.	Hyphes (Oui/Non)	Arbuscules (Oui/Non)	Vésicules (Oui/Non)
1	+	+	+
2	+		
3	+	+	+
...			
...			
...			
49	+		+
50		+	
Fréquence :	p. ex. 80%	p. ex. 70%	p. ex. 20%

3. Calcul

aucun

4. Résultats

Fréquence des hyphes, arbuscules et vésicules

5. Remarques

- L'interprétation des résultats absolus (fréquences) n'est pas encore possible car une expérience suffisante fait encore défaut. On se contentera donc de résultats de mesures comparatives entre sols (diverses charges en polluants, ou séquences chronologiques).
- Avant de conclure par l'analyse de variance sur d'éventuelles différences entre sites, il importe de transformer les données brutes (% de fréquence) selon une fonction arc-sinus. La formule à utiliser est : $\arcsin \sqrt{\text{valeur en \%} / 100}$
- Si les moyens le permettent, il est possible de régler l'arrosage par pesée des pots (2-3 fois par semaine) et complément d'eau jusqu'au poids de référence.
- Il est également recommandé de mesurer le poids sec des racines et des tiges. A la récolte, on compte les plantes par pot et on met à sécher à 105°C les tiges et les racines qui n'ont pas été prélevées pour le test. La masse de ces 50 brins est compensée de la manière suivante : les racines non prélevées pour le test sont égouttées sur du papier kleenex et pesées puis séchées. Le rapport poids sec / poids frais est calculé. Les brins de racine colorées sont également pesés, et leur masse fraîche est convertie en masse sèche en utilisant le rapport précédent.
- Pour des observations de longue durée, il est recommandé de récolter les racines à un stade phénologique déterminé (cf. B-M-PN).

6. Littérature:

- McGonigle, T.P., Miller M.H., Evans, D.G., Fairchild G.L. and Swan J.A., 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495-501.
- Phillips, J.M. and Hayman D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 158-160.

7. Histoire

Version	Type du changement	nouveau	avant
Version 1 (2001)	établissement de la méthode		
Version 1.1 (2003)	Révision méthode	Traduction en français	
Version 1.2 (2020)	éditorial	Publication électronique avec nouveau layout	

Impressum

Éditeur	Agroscope Reckenholzstrasse 191 8046 Zürich www.agroscope.ch/referenzmethoden
Renseignements	Diane Bürge
Copyright	© Agroscope 2020