

QUANTIFICATION DE L'INFECTION ECTOMYCORHIZIENNE
PAR LE DOSAGE DE LA CHITINE FONGIQUE.

par L. BOUGHEDAQUI

Département des Sciences du Sol

Institut National Agronomique.-Alger .-

خلاصة :

=====

تقدر كمية الاصابة المكوريزية بتقدير كمية الكيتين
القطري، و لهذا يخضع الكيتين القطري لتحلل بالاحماض
الذي يحرر العلوكوز أمين في لمحلول وهذا الأخير يقدر
بطريقة قياسي الالوان (الملوان) المطورة من قبل (1969)
هذه الطريقة تسمح لنا بتقدير الاصابة المكوريزية
بصورة صحيحة، و في الواقع قد صلي على نتائج ايجابية
عند تقدير كمية الهيفات في الفطور المكوريزية وعددها.

Résumé

La quantification de l'infection mycorhizienne est réalisée par dosage de la chitine fongique. Afin de la quantifier, la chitine subit une hydrolyse acide quilibre des résidus glucosamine en solution. Ces derniers sont dosés par la méthode colorimétrique développée par TSUJI et al (1969 a). Cette méthode nous permet d'estimer quantitativement de façon plus correcte l'infection mycorhizienne. En effet, des corrélations positives ont été

obtenues entre la quantité de mycélium incluse dans la mycorhize et le nombre de mycorhizes.

Introduction

La quantification de l'infection mycorhizienne était jusqu'à nos jours simplement réalisée par le dénombrement soit des racines courtes mycorhizées soit par comptage de toutes les unités dichotomiques. Cette méthode s'est avérée fastidieuse et subjective en raison des résultats obtenus souvent incorrects. C'est ainsi que PLASSARD (1980) tenta d'évaluer le degré d'ectomycorhization en dosant un composé spécifique de la paroi fongique : la chitine (n'existe dans le règne végétal que chez les champignons et les algues vertes (FOSTER et al, 1960)).

La quantification de la biomasse mycélienne avait déjà été testée par SWIFT (1973) lors du dosage de l'infection d'un basidiomycète croissant sur substrat ligneux. RIDE et DRYSDALE (1972) ont mesuré le degré d'infection de plantes atteintes par des champignons pathogènes.

A notre tour, nous avons tenté de quantifier l'infection mycorhizienne de plants de Pin d'Alep mycorhizés par *Pisolithus tinctorius* (Pers) Coker et Couch (Souche F.12, provenance Géorgie E.U. isolée à partir d'un carpophore récolté sous *Pinus teada* par D.H. MARX) et par une souche de champignons issue d'une mycorhize jaune (partenaire fongique inconnu) isolée à partir de racines mycorhizées de jeunes plants de Pin d'Alep de la forêt de Baïnem (BOUGHEDAQUI, 1984). Il s'agit dans cette étude, d'estimer la masse mycélienne de plants mycorhizés en relation avec le nombre de mycorhizes.

I.- PRINCIPE DU DOSAGE

A.- HYDROLYSE DE LA CHITINE

L'hydrolyse est une hydrolyse acide par des acides concentrés à chaud. Elle provoque à la fois la rupture des liaisons osidiques et acétyl de la chitine, libérant des résidus glucosamine en solution (PLASSARD, 1980) (Fig. 1).

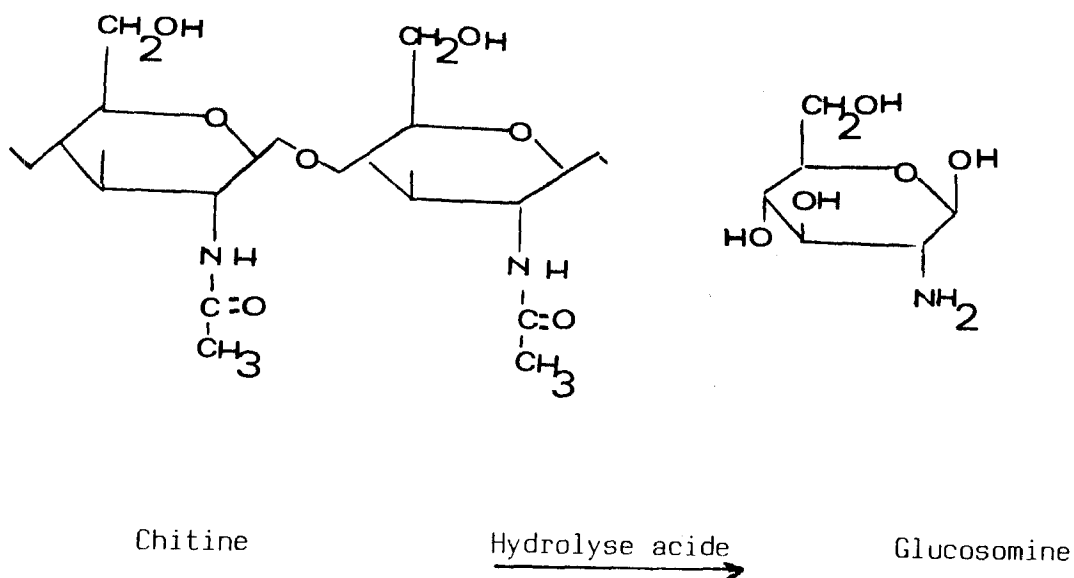


FIGURE 1.- Hydrolyse acide de la chitine

PLASSARD (1980) avait montré comparativement à l'hydrolyse alcaline que l'hydrolyse acide était plus sensible et plus facile à mettre en oeuvre. En effet, l'hydrolyse alcaline n'est jamais complète et il y a perte du matériel fongique traité au cours des nombreux lavages du chitosane (HORTON et LINEBACK, 1965).

B.- DOSAGE COLORIMETRIQUE

Les résidus glucosamine obtenus en solution dans HCl 6N lors de l'hydrolyse acide sont quantifiés par la méthode colorimétrique développée par TSUJI et al (1969 a et b). Les composés obtenus (sucres aminés) en solution sont désaminés par l'acide nitreux et transformés en 2,5 anhydromannoses. L'acide nitreux en excès est détruit par le sulfamate d'ammonium. Après désamination, les composés obtenus réagissent avec le M.B.I.H. (3 méthyl-2-Benzothiazolone hydrazone) en présence de chlorure ferrique et produisent une intense coloration bleue qui devient stable après 30 minutes. On lit l'absorbance à la longueur d'onde de 653 nm.

II.- ESTIMATION DU DEGRE D'ECTOMYCORHIZATION

A.- MATERIEL ET METHODES

La méthode d'hydrolyse acide a été testée :

- sur des thalles de *Pisolithus tinctorius* âgé de 1 mois
- sur des thalles de champignon issu de la mycorhize jaune âgés de 1 mois
- sur des racines non mycorhizées de Pin d'Alep
- sur des racines de Pin d'Alep mycorhizées par l'une ou l'autre des 2 souches précédemment citées.

B.- HYDROLYSE DE LA CHITINE FONGIQUE

Cette méthode de quantification nécessite de se référer à des teneurs connues en chitine chez des mycéliums cultivés in vitro (PLASSARD et al, 1980). L'hydrolyse de quantités croissantes de chitine fongique (1 à 20 mg de mycélium par 10 ml d'HCl) s'ajuste à une droite de regression passant par l'origine (Fig.2). Les quantités moyennes de glucosamine par mg de matière sèche sont respectivement pour :

- *Pisolithus tinctorius* = 42,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ M.S. \pm 7,8
- Mycorhize jaune = 37,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ M.S. \pm 5,5

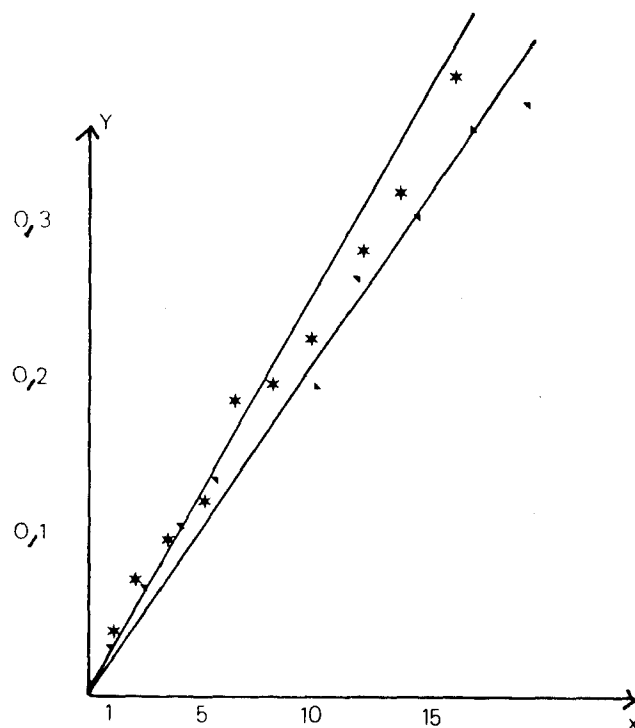


FIGURE 2.- Relation entre l'absorbance et la quantité de matière sèche de mycélium hydrolysée par HCl

C.- HYDROLYSE ACIDE DE RACINES DE PIN D'ALEP
NON MYCORHIZE

Cette méthode de quantification nécessite également de disposer de témoins non mycorhizés. Des poids de matière sèche de racines non mycorhizées s'étalant de 14,5 mg à 35 mg sont également hydrolysés. La relation entre l'absorbance et la quantité de M.S est linéaire (Fig.3), mais l'ordonnée à l'origine est différente de zéro. L'intensité moyenne de la réaction colorée fournie par un milligramme de M.S de racines non mycorhizées correspond à $8,0 \pm 0,9$ microgrammes de glucosamine.

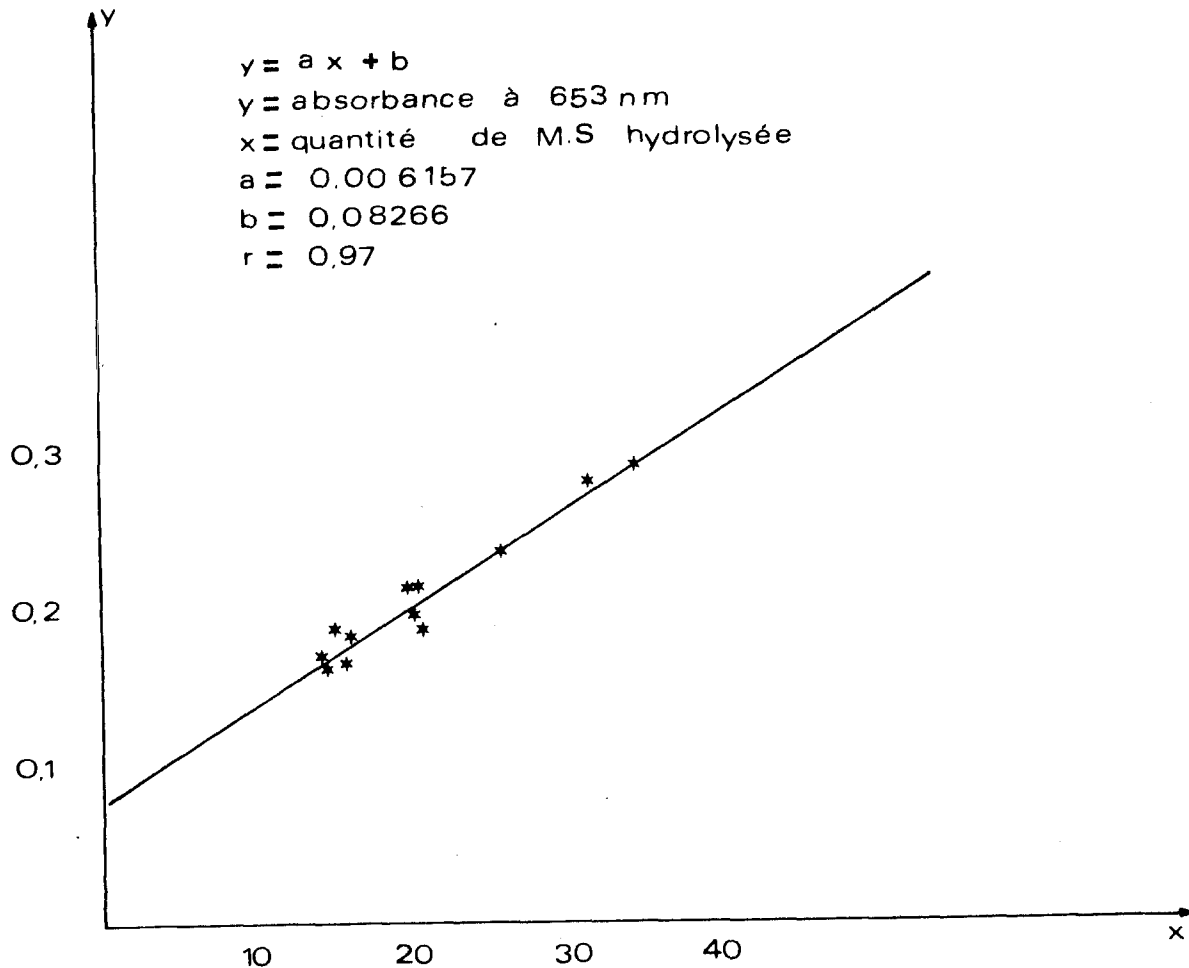


FIGURE 3.- Relation entre la quantité de M.S. de systèmes racinaires de Pin d'Alep non mycorhizés et l'absorbance à 653 nm.

TABLEAU 1.- Hydrolyse des systèmes racinaires de Pin d'Alep mycorhizés par *Pisolithus tinctorius*.

Nombre de racines courtes mycorhizées (N)	Quantité de M.S. de racines de Pin d'Alep mycorhizé (Z)	Absorbance à 653 nm (Y)	Masse de M.S. de Mycélium (X ₂)
8	32	0,286	0,75
9	33,5	0,300	0,88
5	27	0,240	0,37
15	33,10	0,325	1,59
4	26	0,230	0,27
12	28,20	0,274	1,05
14	32,50	0,320	1,55
12	31,30	0,302	1,27
15	34,20	0,333	1,61
18	34,7	0,350	1,97

TABLEAU 2.- Hydrolyse des systèmes racinaires de Pin d'Alep mycorhizés par le champignons issu de la mycorhisé jaune.

N	Z	Y	X ₂
2	24,5	0,223	0,064
3	27	0,241	0,15
3	29	0,248	0,17
4	32	0,278	0,34
6	33,5	0,293	0,52
7	33	0,293	0,62
8	34	0,306	0,83
10	36	0,329	1,16
13	36,5	0,338	1,34
14	36	0,338	1,44

D.- ESTIMATION DE LA MASSE MYCELIENNE

Les valeurs d'absorbance des plants mycorhizés par *Pisolithus tinctorius* et la mycorhize jaune figurent dans les tableaux 1 et 2. Elles représentent la somme des réponses des tissus du pin et du mycélium (PLASSARD, 1980-1983).

L'absorbance totale est donc une fonction linéaire de la masse de racine et de la masse de mycélium (PLASSARD, 1980)

$$Y = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2$$

avec Y = absorbance totale mesurée à 653 nm

X_1 = masse de M.S. de racines

X_2 = masse de M.S. de mycélium

Nous pouvons ainsi déterminer :

$$X_2 = \frac{(Y - a_0) - a_1 Z}{a_2 - a_1} \quad \text{avec } Z = X_1 + X_2 \text{ (masse de matière sèche totale).}$$

Les différents coefficients sont déterminés expérimentalement. On estime ainsi la masse mycélienne X_2 des plants mycorhizés (Tableaux 1 et 2).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Des corrélations positives ont été obtenues entre la teneur en chitine des racines et le nombre de mycorhizés déterminé par comptage (Fig. 4 et 5).

($r = 0,81$ pour *Pisolithus tinctorius* , F.12)

($r = 0,99$ pour la mycorhizé jaune)

Cette méthode de dosage par hydrolyse acide de la chitine fongique permet d'obtenir une estimation correcte de l'infection mycorhizienne ; elle pourra donc à l'avenir être substituée au comptage fastidieux des mycorhizes. Cependant, il conviendra d'être prudent quant à l'interprétation des résultats car cette méthode ne tient pas compte de l'état physiologique des mycorhizes.

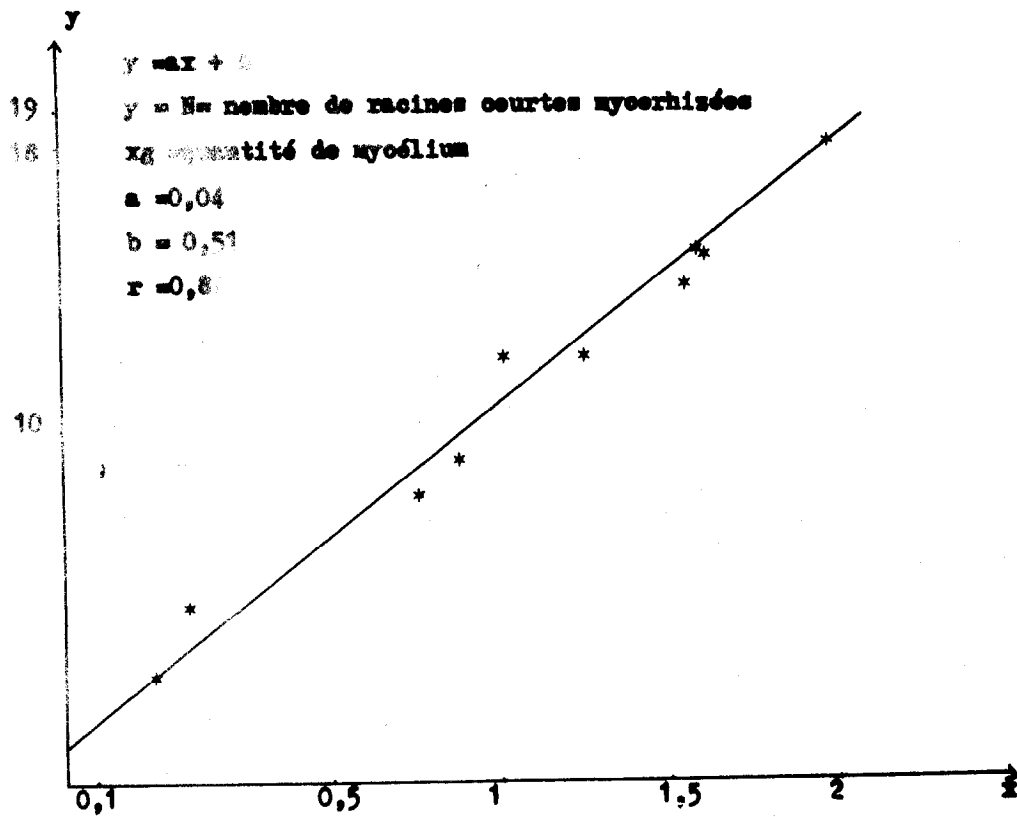


FIGURE 4.- Relation entre la quantité de mycélium de l'isolat F.12 et le nombre de racines courtes mycorrhizées de Pin d'Alep.

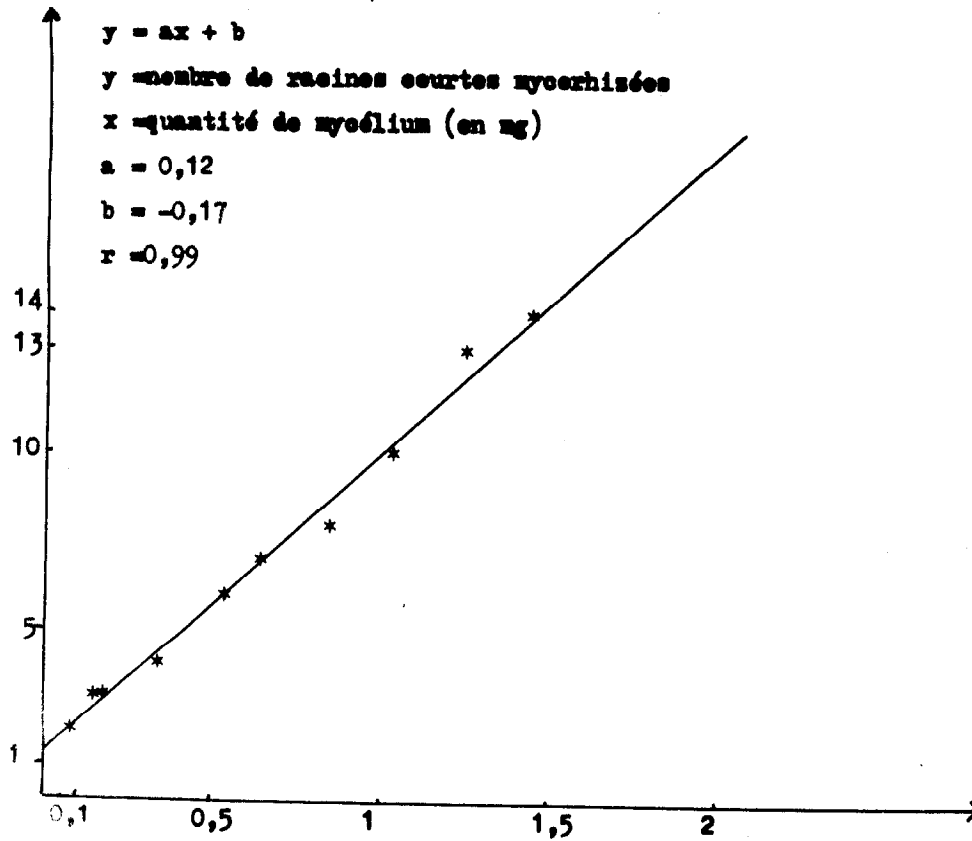


FIGURE 5.- Relation entre la quantité de mycélium de l'isolat issu de la mycorhize jaune et le nombre de racines courtes mycorrhizées.

BIBLIOGRAPHIE

- BOUGHEDAQUI L., (1984).- Etude sur les mycorhizes du Pin d'Alep (Pinus halepensis Mill)
Thèse de Magister en Sciences Agronomiques, option Aménagement et Mise en Valeur I.N.A., 79 p.
- FOSTER A.B., WEBBER J.M., (1960).- Chitin In "advances in carbohydrate chemistry".
M.L. WOLFROM ed., Ac. Press, New York, 15, 371-393.
- HORTON D., LINE BACK D.R., (1965).- N-deacetylation chitosan from chitin. In "Methods in Carbohydrate chemistry".
R.L. WHISLER ed., 5, 403-406.
- PLASSARD C., (1980).- Quantification de l'infection ectomycorhizienne : Etude d'une méthode de mesure colorimétrique.
Thèse D.E.A. de Physiologie Végétale
Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- PLASSARD C., (1983).- Etude de la croissance de champignons mycorhiziens. Evaluation de la masse mycélienne par dosage de la chitine. Etude des enzymes de l'assimilation de l'azote minéral.
Thèse Docteur-Ingénieur .- Université des Sciences et Techniques du Languedoc 68 p.
- PLASSARD C., MOUSAIN D., SALSAC L., (1983).- Dosage de la chitine fongique : Application à l'estimation de la masse mycélienne présente dans les racines mycorhizées du Pin maritime cultivé in vitro ou en pépinière.
C.R. Acad. Sc. Paris, t. 297 Série III, 233-236.
- RIDE J.P., DRYSDALE R.B., (1972).- A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue .
Physiol. Plant. Pathol., 2, 7 -15.

- SWIFT M.J., (1973) .- The estimation of mycelial biomass by determination of the hexosamine content of wood tissue decayed by fungi . Soil.Biol. Bioch., 5, 321-332.
- TSUJI A., KINOSHITAT., HOSHINO M., (1969 a).- Microdetermination of hexosamines.
Chem. Pharm. Bull., 17, (1), 217-218.
- TSUJI A., KINOSHITAT T., HOSHINO M., (1969 b).- Analytical chemical studies on amino-sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride.
Chem. Pharm. Bull. 17 (7), 1505-1510.