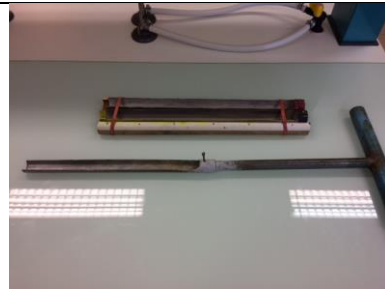


Option 2 : Application de la microphotographie photonique , en lien avec la trufficulture.

Les trufficulteurs viendront en apportant **des carottes de prélèvement de terre.**

Une carotte correspondra à un arbre en production et une autre à un arbre correspondant à l'échantillon négatif.



Tarière pour les prélèvements

I Travail sur les échantillons de terre. Durée 1 h/3h

1/ Prendre une photographie des deux carottes.

2/ Faire un schéma à l'échelle en essayant de délimiter les différents substrats, zones, couleurs de ces échantillons.

a/ Pour cela, partager en deux une feuille A4, que vous assemblez dans la longueur pour schématiser les différentes couches du carottage.

b/ Déterminer 5 zones différentes à étudier du niveau 0 (sol) en direction du sous-sol. Définir z1,z2,z3,z4 et z5 pour l'arbre négatif et z'1,z'2,z'3,z'4 et z5 pour l'arbre positif.

3/ Aliquoter ces 5 zones pour les deux carottages dans :

a/ 5 pots de prélèvement pour une analyse au microscope :

Pot en plastiques blancs.

Il faut noter la date, la nature de l'arbre, et la zone

b/ 5 tubes de dilution (microbiologie), en introduisant 1gramme de chaque zone dans un tube de dilution pour un suivi microbiologique. (cf partie III).

Il faut noter la date, la nature de l'arbre, et la zone

4/ Etude de la microfaune par Monsieur Daronne

Verser l'ensemble de la terre de la carotte dans l'appareil de berlèse.

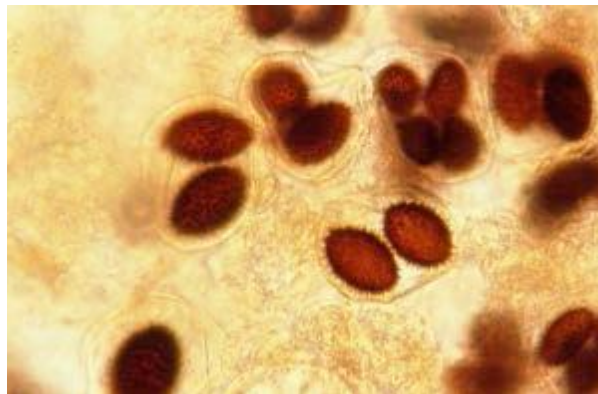
II Microphotographie et imagerie des sols. Durée 1h/3h

Il faudra avec les trufficulteurs faire des observations des différentes zones des carottes.

Objectif de la séance : idée 1 : du 20 septembre 2017.

Manipuler les microscopes du laboratoire : Fond clair, fond noir et contraste de phase.

Essayer de réaliser une recherche des spores dans les différentes zones des carottages.



Spores :

Protocole : A réaliser en 1h.

- **Réaliser de lames lamelles des échantillons de terre. Pour cela prendre un échantillon de terre à diluer dans de l'eau distillée. Faire une observation de la lame en parcourant l'ensemble de la lamelle. Réaliser l'opération 10 fois.**
- Prendre 10 photographies en microscopie photonique des 10 zones étudiées.
- Rendre un tableau de 10 photographies en nommant correctement les zones et la date du prélèvement.

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
Arbre positif					
Arbre négatif					

- Imprimer les résultats en feuille 4A et donner une version imprimée aux trufficulteurs.

III Etude microbiologique du sol. 1h/3h

Il a été découvert que les différentes espèces de truffes hébergeaient entre un et dix millions de bactéries (Barberi et al, 2007).

La présence de souches bactériennes ayant un impact positif sur les champignons auxquels elles sont associées est déjà bien documentée (Frey- Klett et al, 2007), majoritairement sur des Basidiomycetes mais aussi chez *T. borchii*, (Sbrana et al,2000), où des *Pseudomonas* ayant une activité anti-pathogène ont été découverts. Ces bactéries, appartenant aux phyla des Proteobacteries, Firmicutes ou Actinomycetes majoritairement, sont également retrouvées à l'intérieur de la truffe, ceci renforce l'hypothèse qu'elles pourraient jouer un rôle dans le développement de l'ascocarpe.

Nous allons essayer de mettre en avant une petite étude complémentaire à votre travail de microscopie (Séance principale) pour essayer de faire un petit apport scientifique au syndicat des trufficulteurs de la Drôme. Il faudra rester modeste car nous sommes très loin des activités de recherche de L'INRA et des différentes recherches sur ce domaine.

Il existe des souches de bactéries productrices de sidérophores ayant des actions positives sur l'apparition de truffes, comme les *Pseudomonas*.

Objectif de la séance :

Essayer d'isoler des colonies bactériennes issues des 5 zones du carottage.

Protocole : A réaliser en 1h

Vous disposez de 10 tubes de dilutions contenant 1gramme de sol.

Réaliser une dilution au 1/10000 de chaque tube.(tube déjà dilué 10 fois)

Vous disposez ainsi de 20 tubes de dilution. Une dilution au 1/10 et une série diluée au 1/100000.

Réaliser un ensemencement de chaque tube dans une boite de culture.

Milieu du jour : ----- **Milieu King B**

Définir la composition chimique de la boite de pétri et expliquer ce que vous devez potentiellement trouver

Milieu de culture King B :

Le milieu King B (Bio-Polytone 20 g/L, phosphate bipotassique 1,5 g/L, sulfate de magnésium 1,5 g/L, gélose 14 g/L, Bio-Mérieux) est utilisé en mélangeant 37 g de poudre à la ml de glycérine dans un litre d'eau distillée et permet de dénombrer les *Pseudomonas fluorescens*, producteurs connus de sidérophores.

Rôles des *Pseudomonas fluorescens*

Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries très étudiées car ce sont des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) douées d'une forte capacité à coloniser les racines (SCHROTH et HANCOCK, 1982).

Elles peuvent permettre aussi l'amélioration de la colonisation fongique en changeant entre autre la plasticité de la membrane cellulaire, l'exudation et la concentration de régulateurs de croissance (MEYER et al., 1986).

C'est une espèce ubiquiste et qui, grâce à sa rapidité de croissance, peut devenir prédominante sous certaines conditions : pH proche de la neutralité, matière organique en solution, bonne oxygénation, absence de facteurs de croissance (BERGEY, 1984). Leur rôle de PGPR pourrait être dû à l'inhibition d'organismes phytopathogènes par privation de fer (KLOPPER et al., 1980).

Divers travaux traitent ainsi du rôle de ces bactéries sur le contrôle biologique des microflores rhizosphériques (COOK et al., 1976 ; PETER et al., 1983)

La question des interactions entre les bactéries et la truffe est effectivement intéressante; les bactéries sont extrêmement présentes tout au long du cycle de vie de la truffe mais leurs rôles dans sa biologie reste pour le moment assez énigmatique et beaucoup d'hypothèses sont proposées:

rôle dans la production de l'arôme,
dans la croissance du mycélium et le développement de la mycorhize,
dans la dégradation de l'ascocarpe.

Les *Pseudomonas fluorescens* sont effectivement retrouvées parmi beaucoup d'autres, elles peuvent être PGPR mais aussi antagonistes. Vous retrouverez des *Pseudomonas fluorescens* dans beaucoup de sols qu'il y ait ou non de la truffe et cela ne sera pas indicateur de grand chose en ce qui concerne la trufficulture. Cela étant dit, c'est un exercice pédagogique intéressant de montrer que le sol regorge de bactéries, très diversifiées et que bactérie ne signifie pas maladie. Les *pseudomonas fluorescens* sont effectivement faciles à cultiver sur du KB (si vous pouvez illuminer vos plaques aux UV, Vous pourrez également montrer la fluorescence, signe de production de sidérophores).

Vous pouvez envisager de faire en parallèle un étalement sur milieu TSA (Tryptic Soy Agar, dilué au 10^{ème}) sur lequel vous aurez beaucoup plus de types de bactéries qui poussent (et aussi des champignons), ce qui pourrait vous permettre d'illustrer l'aspect "diversité".

Enfin, dans la mesure où vous aborder les Actinomycetes dans votre cours, vous pouvez aussi faire un test simple pour montrer la présence de ces bactéries : en chauffant vos solutions bactériennes 60min à 50°C, seules les bactéries présentes sous forme de spores survivront et pourront se développer sur le milieu (TSA par exemple).

Les actinomycètes étant filamenteuses (et aussi très souvent productrices d'antibiotiques), cela vous permettra d'illustrer les différents "types" bactériens et leurs différentes capacités fonctionnelles.

Si vous trouvez des mycorhizes de truffes, vous pouvez faire des empreintes de vos mycorhizes sur les différents milieux de culture, vous devriez voir des bactéries se développer au niveau de l'emprunte. Tant la diversité que la densité devraient fortement différer de celle de vos échantillons de sol.

Qu'est-ce qu'une mycorhize ?

La truffe que tout le monde connaît n'est que le carpophore d'un champignon souterrain (hypogé). La truffe est une des étapes du cycle de ce champignon.

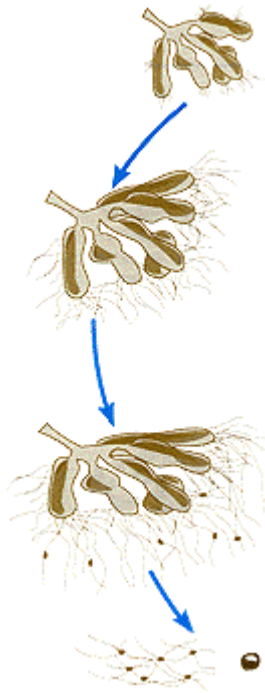
Le mycélium est en symbiose avec un arbre hôte, cette association avec les radicelles de l'arbre est une mycorhize. Ce système de coopération est courant dans la nature. La truffe, une fois constituée, vit sa propre vie et continue sa maturation indépendamment de son mycélium. Elle a coupé en quelque sorte son cordon ombilical !

Toutefois, même si elle est séparée du réseau mycélien originel, des filaments de mycélium continuent de relier la truffe avec son environnement direct (voir aussi la page sur [le brûlé](#)). Ils sont visibles sur certaines truffes fraîchement récoltées.

« Les mycorhizes (du grec : *mukès* = champignon, *rhiz* = racine) sont des organes mixtes formés par des racines et des champignons symbiotes du sol. Presque toutes les plantes se développent en formant des mycorhizes. Il en existe de plusieurs types différents, distincts par leur morphologie et par les champignons qui les engendrent. » (Extrait de : ENSSAA-INRA-INRAP - Dijon : Les mycorhizes ; 1985).

Pour simplifier : certaines parties du champignon s'intègrent et s'insinuent dans les organes microscopiques des racines de l'arbre-hôte. Cette association favorise des échanges chimiques utiles à l'arbre et au champignon.

Au microscope, une mycorhize de truffe ressemble à une sorte de manchon qui recouvre les radicelles. Des filaments (le mycelium) se développent en surface lui donnant un aspect plus ou moins chevelu en fonction de l'espèce de truffe. A partir d'avril, des petites sphères, les primordia (des "embryons" de truffes), se forment sur le mycelium. Seulement quelques-uns se développeront complètement et donneront la fameuse truffe.



Avantages des mycorhizes :

Les bénéfices des mycorhizes pour la plante-hôte sont multiples et font l'objet de nombreuses [recherches](#). La présence des mycorhizes multiplie la surface utilisée par le réseau racinaire et permet ainsi :

- Meilleure absorption de l'eau (au détriment des herbacées)
- Des réactions biochimiques facilitent l'absorption des micro-éléments utilisés par la plante (phosphore...).
- Des actions antibiotiques assurent une protection contre certains micro-organismes pathogènes des racines.
- Rôle de filtre / barrière de protection biochimique.
- Stabilisation de la structure du sol par le réseau mycélien.

Avec quelques conséquences pour la plante-hôte

- Accroissement de la résistance à la sécheresse (par augmentation de la surface de contact racine/sol grâce aux mycorhizes).
- Plus grande fermeté des tissus végétaux augmentant la période de conservation de certaines plantes.
- Amélioration notable du taux de survie des plantes l'hiver.

Mycorhizes de *Tuber melanosporum*.

>> **En savoir plus** : [Les champignons mycorhiziens](#) de Nadia Dechamplain (PISTES) et Lyne Gosselin (CRBF) - Université Laval, juillet 2002.

La conséquence la plus remarquable des mycorhizes

- Elles accélèrent significativement la croissance des jeunes plants-hôtes (avantage utilisé en arboriculture grâce à des procédés brevetés INRA).

Et, accessoirement

- Chez certaines espèces, les mycorhizes donnent naissance à un carpophore qui a trouvé le moyen d'attirer les sangliers et quelques *Homo sapiens* des bois qui perdent vite leur côté *sapiens* quand il s'agit de courir après les... truffes et autres champignons !

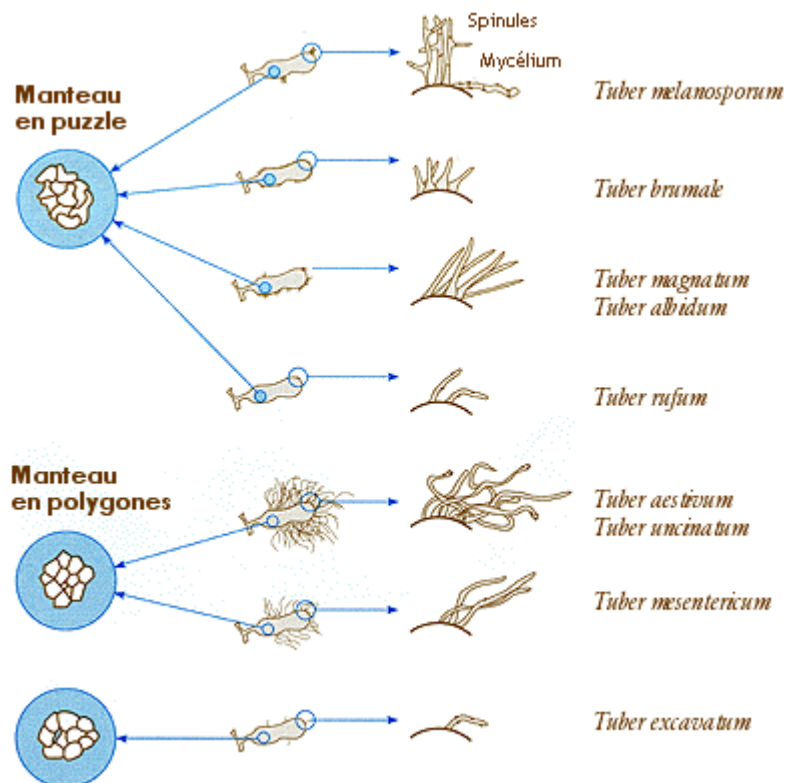
L'une des conséquences des mycorhizes est le brûlé visible sur le sol autour des arbres.

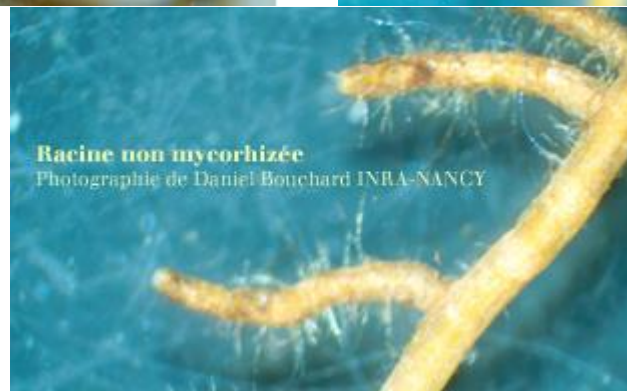
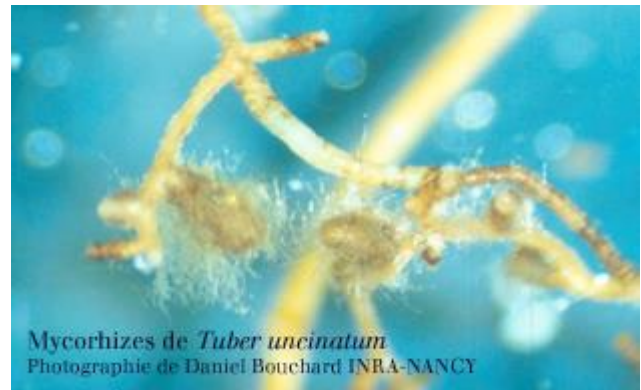


● Dessins extraits de « La Truffe, guide pratique » Edité par le Ctifl, 22, rue Bergère, 75009 Paris.

Un ouvrage de base à mettre en toutes les mains des trufficulteurs en herbe.

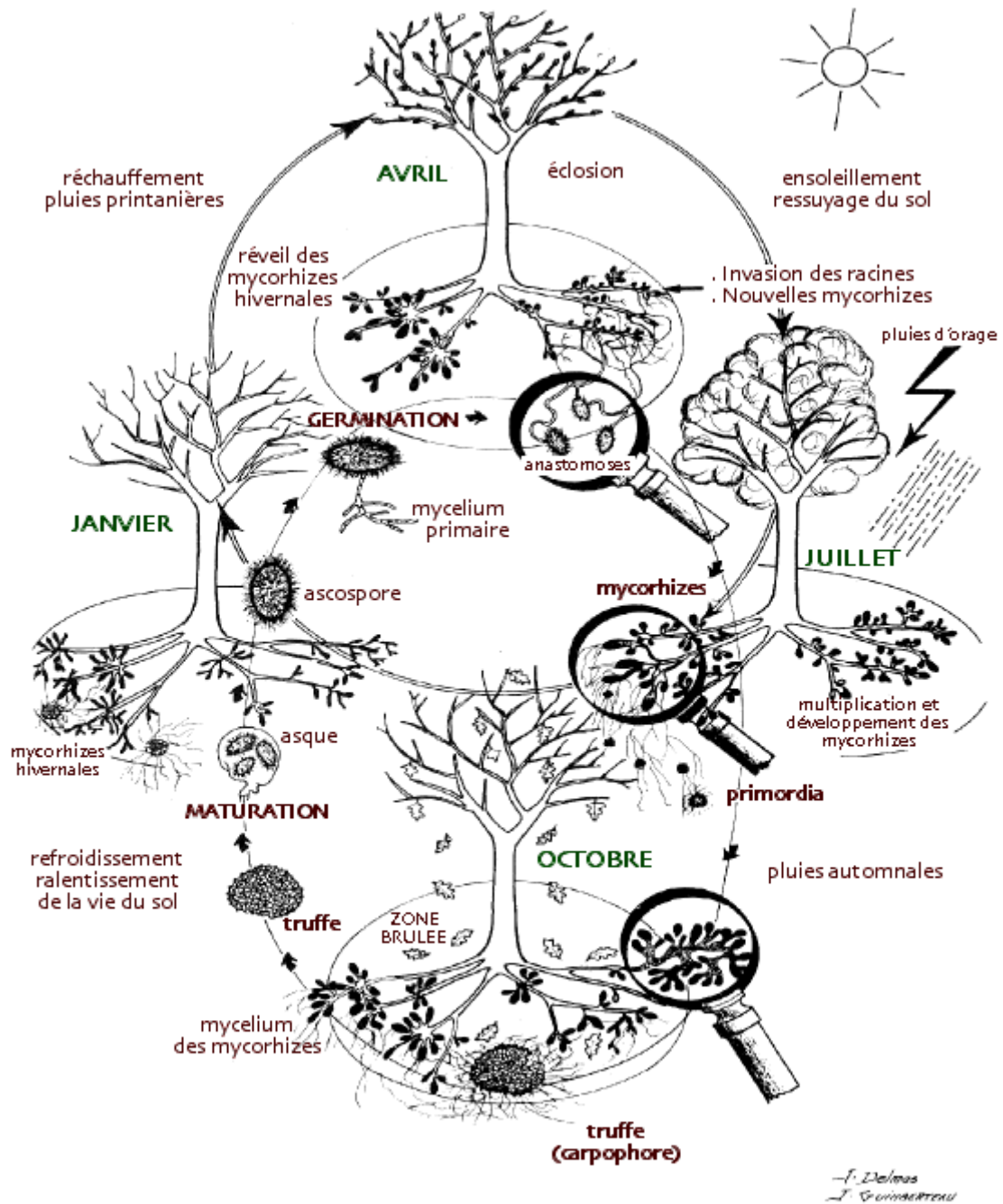
Consulter la bibliographie



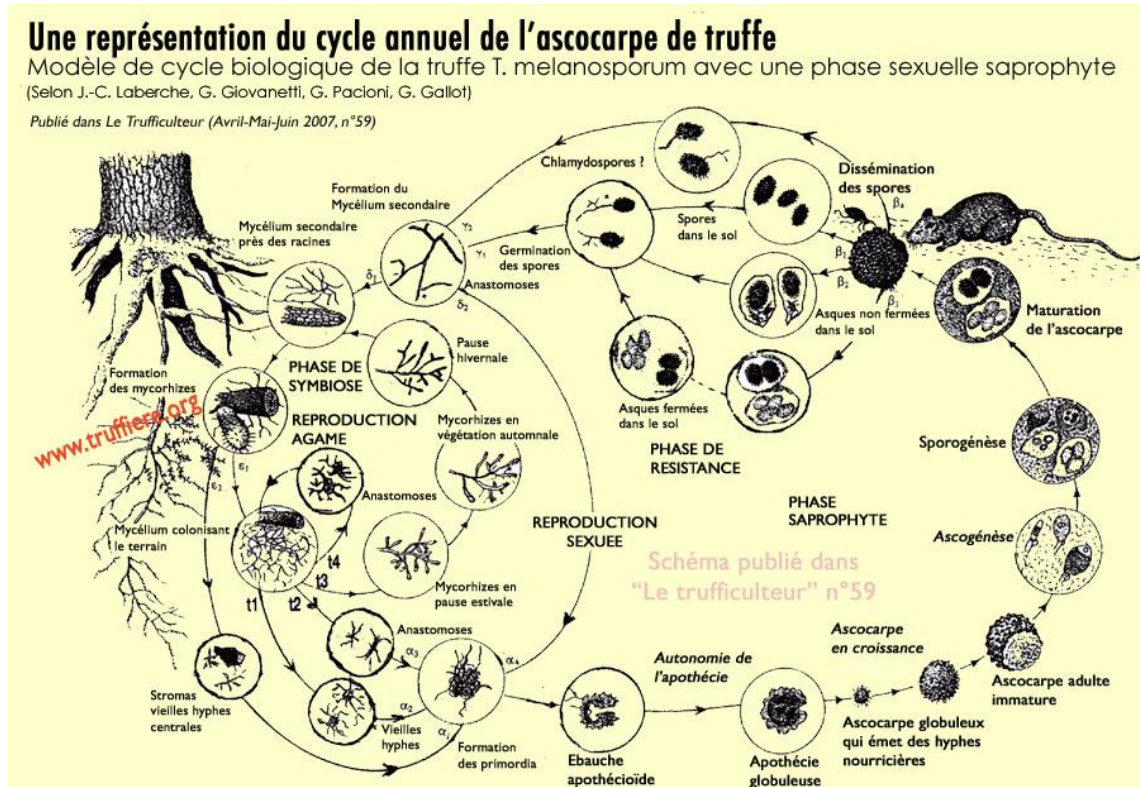


Cycle de la truffe (*T. melanosporum*)

Donné à titre indicatif, car il y a encore bien des aspects encore inconnus sur ces cycles.



Cycle biologique de la truffe et de son hôte
 (Dessin reproduit à partir de « La truffe et sa culture » INRA, 1983, page 14.)



Dessin extrait de la revue "le Trufficulteur Français" N°59 - 2007
 Titre : « Représentation du cycle annuel de l'ascocarpe de truffe –

Modèle de cycle biologique de *Tuber melanosporum* avec une phase sexuelle saprophyte »