



Collection Canadienne des

CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS ARBUSCULAIRES – CCCMA

**Protocoles de cultures in vivo
et in vitro**



Agriculture et
Agroalimentaire Canada

Agriculture and
Agri-Food Canada

Canada

© Sa Majesté la Reine du Chef du Canada, représentée par le ministre de l'Agriculture et de l'Agroalimentaire, (2021)



Graphiques ©BioRender - biorender.com

No de catalogue A59-81/2021F-PDF

ISBN 978-0-660-40023-5

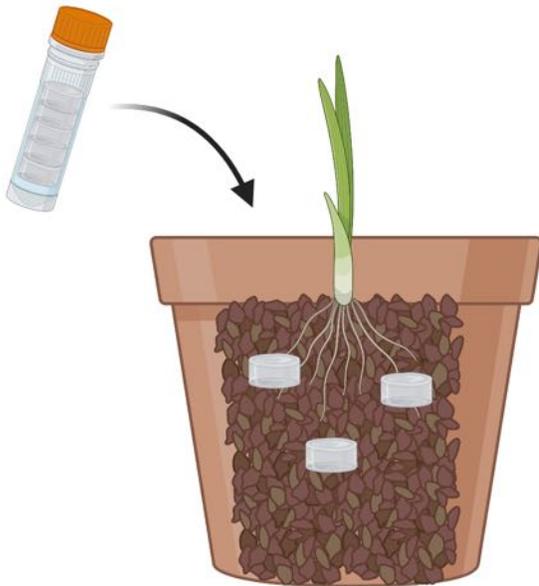
No d'AAC 13083F

Protocole 1 : Démarrer une culture in vivo à partir de spores provenant de culture in vitro

Étape 1. Préparation des pots

Humidifier le sol et autoclaver à deux reprises pendant 60 min.

Tremper les pots dans une solution savonneuse, puis dans une solution d'eau de Javel pendant une heure, rincer abondamment.



Étape 2. Inoculation

Arroser le sol. Déposer les rondelles de gélose contenant les spores dans le sol, 2-3 cm sous la surface, pour éviter le dessèchement.

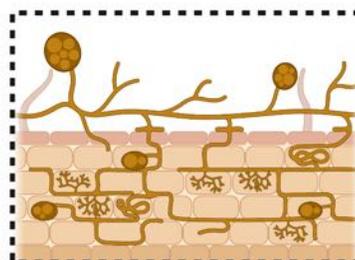
Planter l'hôte. Utiliser une plantule semée dans un sol stérile.

Étape 3. Cultivation

Déposer le pot dans un sac scellé (type Sunbag avec une membrane pour les échanges gazeux) pour éliminer les risques de contamination aérienne.

Arroser et fertiliser au besoin en utilisant un fertilisant à faible teneur en phosphore.

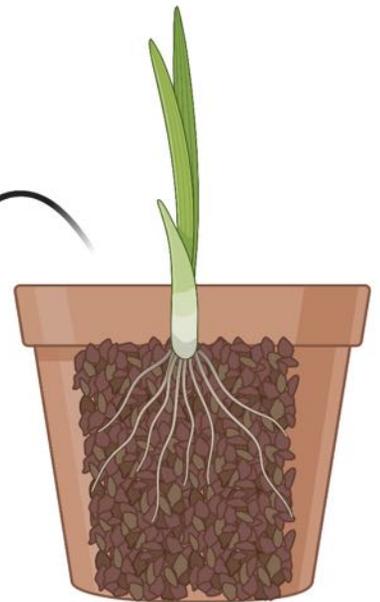
Dépendamment de la croissance de la plante, les spores devraient être prêtes pour extraction en 6-8 mois.



Protocole 2 : Extraire des spores d'une culture in vivo

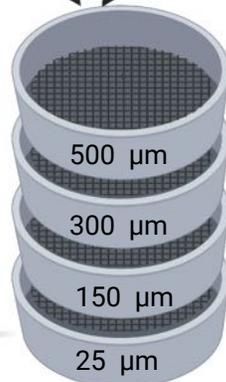
Étape 1. Prélèvement du sol

Prélever un échantillon de sol d'une culture établie depuis au moins 6-8 mois.



Étape 2. Tamisage humide

Procéder au tamisage humide du sol à travers les 4 tamis.



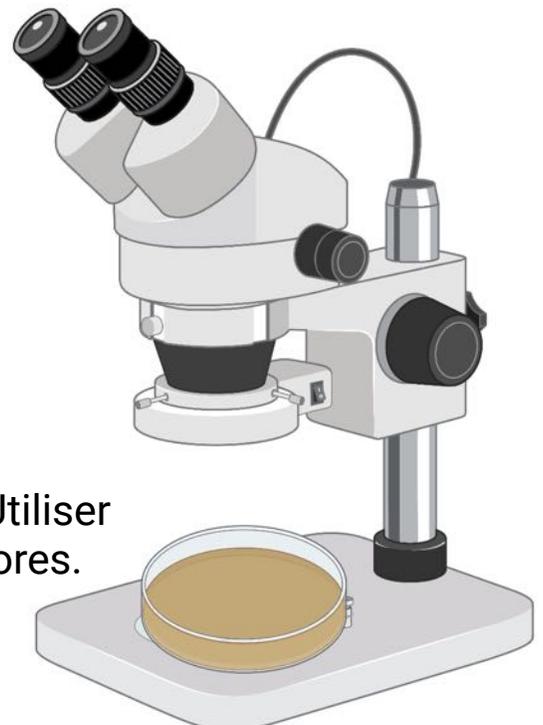
Étape 3. Transfert

Avec de l'eau, transférer chaque fraction de sol dans un plat transparent.



Étape 4. Observation

Observer chaque plat au stéréomicroscope. Utiliser des pinces et une pipette pour extraire les spores.

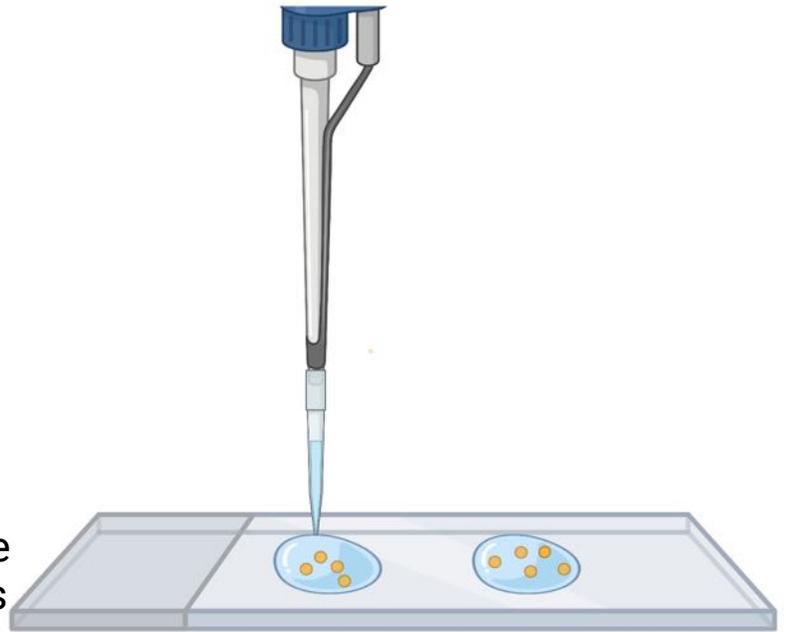


Protocole 3 : Monter les spores sur une lame de microscope



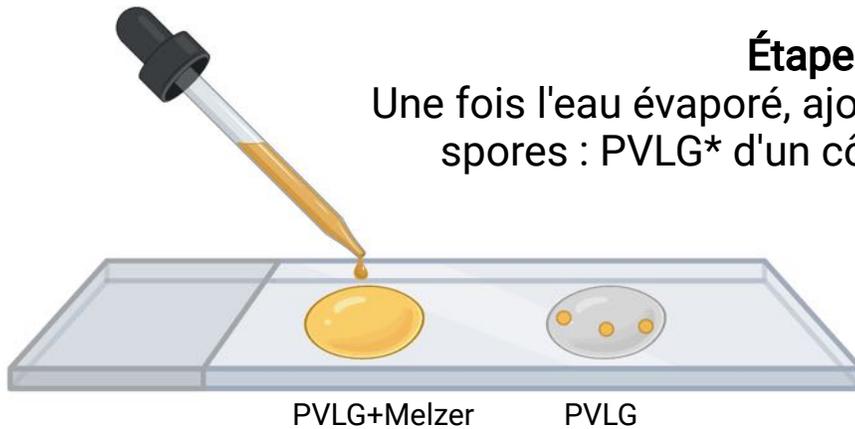
Étape 1. Récolte des spores

Extraire les spores d'une fraction de sol.



Étape 2. Transfert des spores

Transférer les spores sur une lame de microscope : 2 gouttes d'eau avec les spores.



Étape 3. Ajouter le milieu de montage

Une fois l'eau évaporé, ajouter une goutte de milieu sur les spores : PVLG* d'un côté et PVLG + Melzer de l'autre.

Étape 4. Lamelles

Ajouter les lamelles et tapoter la surface des lamelles pour écraser les spores. Laisser sécher la lame pendant 24 heures avant de l'observer.



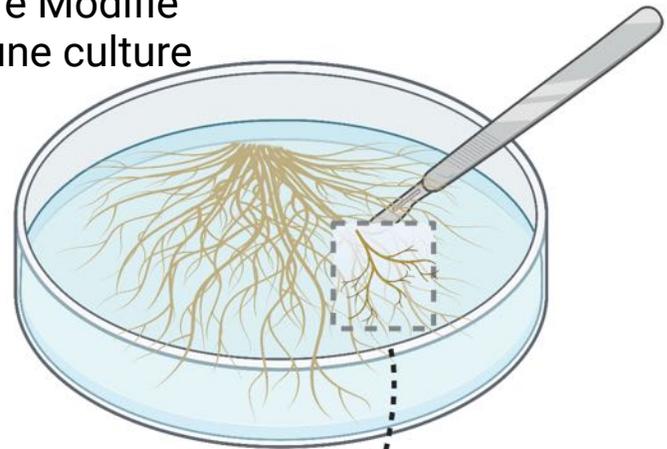
*polyvinylalcohol-lactic acid-glycerol

Protocole 4 : Culture de racines transformées par insertion de l'ADN-T* du plasmide Ri

Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

Étape 1. Prélèvement de racines

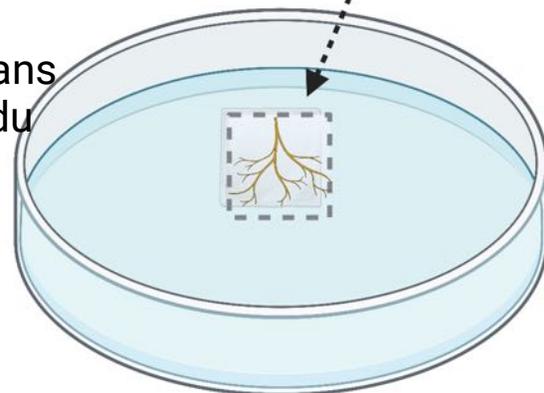
Couper un morceau de milieu de culture Modifié Strullu et Romand (MSR) provenant d'une culture établie depuis environ un mois.
Choisir des racines pâles et ramifiées.



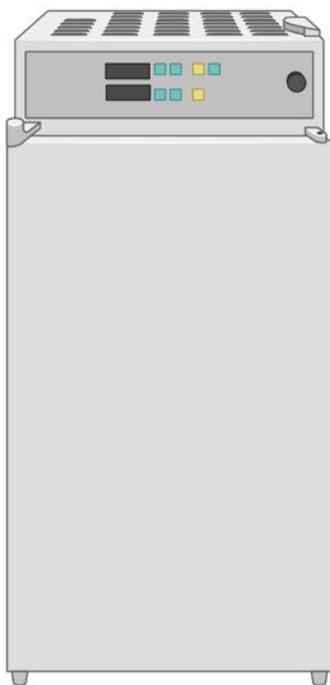
Milieu MSR

Étape 2. Transfert

Transférer le morceau de gélose sur dans une nouvelle boîte de Petri contenant du milieu MSR.



Milieu MSR



Étape 3. Incubation

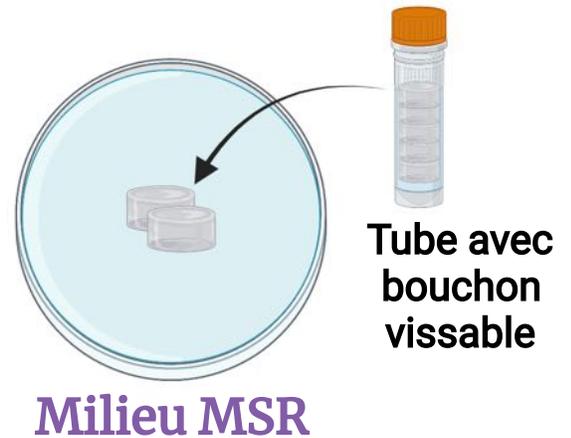
Incuber les boîtes de Petri à 26°C à l'obscurité. Selon le géotropisme de la racine, les boîtes de Petri devront être incubées à l'envers. Les racines doivent être repiquées mensuellement.

*ADN de transfert

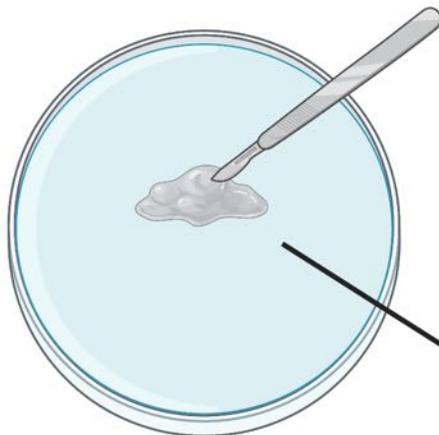
Protocole 5 : Établir une culture in vitro à partir de spores stériles

Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

Étape 1. Déposer les rondelles de gélose contenant les spores sur le milieu de culture Modifié Strullu et Romand (MSR). Jusqu'à 4 boîtes de Petri peuvent être préparées avec le contenu d'un tube.

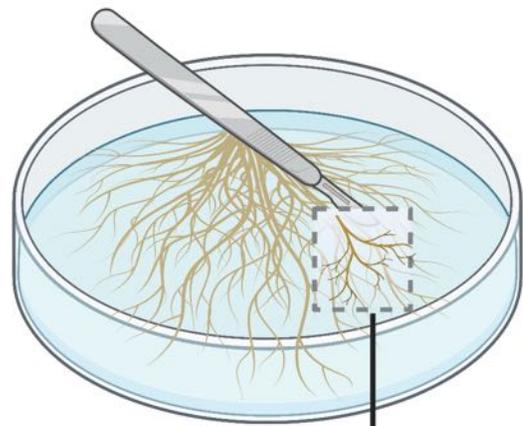


Étape 2. Couper les rondelles de gélose en petits morceaux.



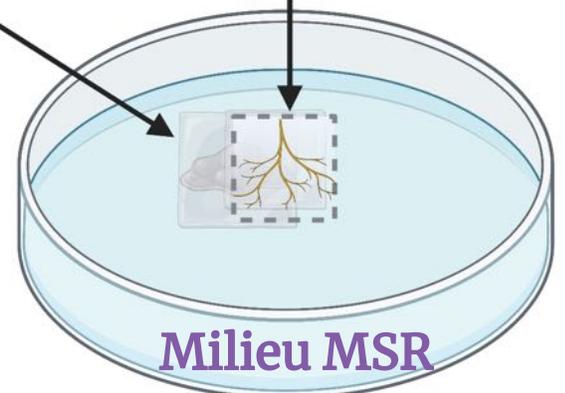
Milieu MSR

Étape 3. Couper un morceau de gélose d'une culture de racines transformées établie depuis environ un mois. Sélectionner des racines pâles et ramifiées.



Milieu MSR

Étape 4. Déposer le carré de gélose avec racines par dessus les rondelles de gélose écrasées. Presser doucement les racines pour coller les morceaux de gélose ensemble.



Milieu MSR

Étape 5. Incuber les boîtes de Petri à 26°C à l'obscurité.

Protocole 6 : Établir une culture in vitro à partir d'une autre culture

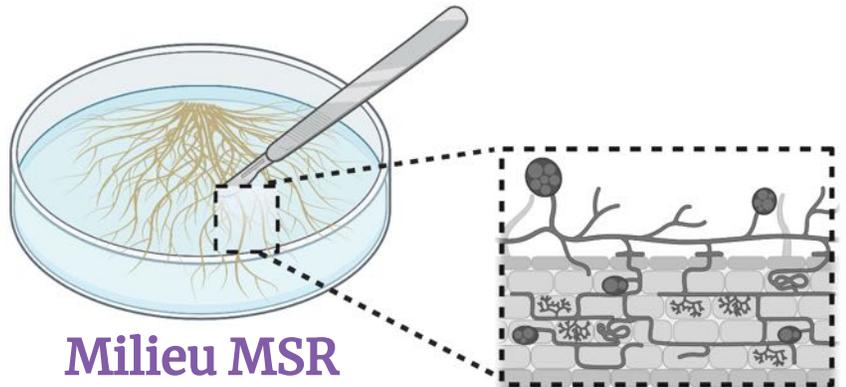
Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

Étape 1. Couper un morceau de milieu de culture Modifié Strullu et Romand (MSR) d'une **culture de racines transformées** établie depuis environ un mois. Choisir des racines pâles et ramifiées.



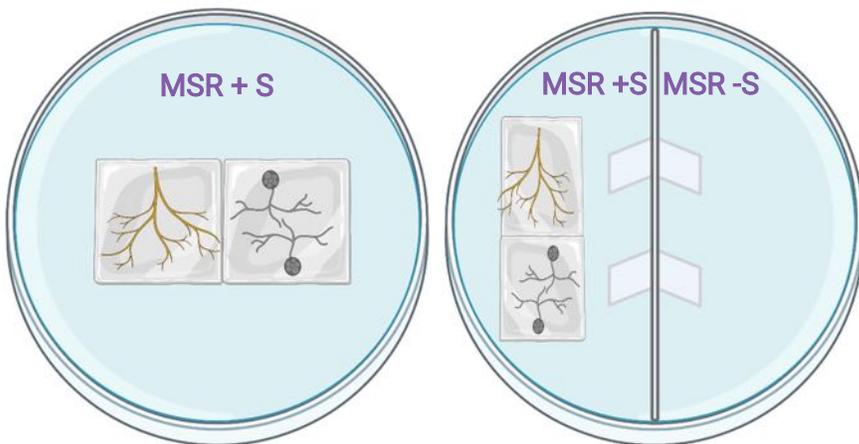
Milieu MSR

Étape 2. Couper un morceau de gélose d'une **culture de racines inoculée** qui contient de nombreuses spores saines (avec lipides).



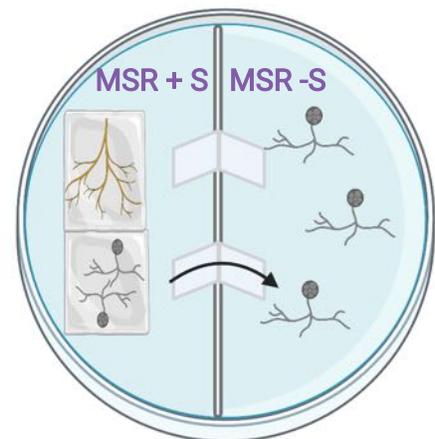
Milieu MSR

Étape 3. Transférer le carré de racines et de spores dans une boîte de Petri mono- ou bi-compartmentée.



Pour une boîte de Petri bi-compartmenté, placer les spores et les racines dans le compartiment MSR + sucrose (S). Les hyphes vont traverser les ponts de papier et la sporulation aura lieu dans le milieu sans sucrose.

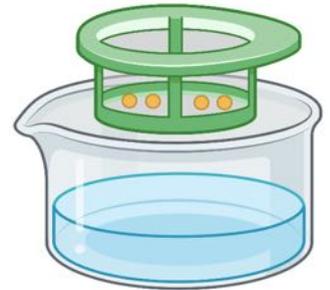
Étape 4. Incuber les boîtes de Petri à 26°C à l'obscurité.



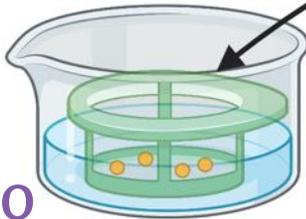
Protocole 7 : Stériliser des spores (partie 1)

Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

Étape 1. Sous une hotte à flux laminaire et à l'aide d'une pipette, transférer les spores dans un tamis de 40 µm déposé dans un plat en verre.

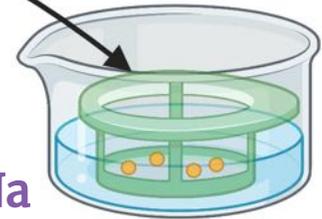


Étape 2. Immerger le tamis dans de l'eau distillée stérile. Agiter doucement pendant 5 minutes en changeant l'eau deux fois. Jeter le liquide.



H_2O

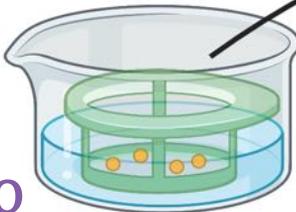
Étape 3. Immerger dans une solution de Chloramine T 2% avec 1-2 gouttes de Tween. Agiter doucement pendant 3 minutes. Jeter le liquide.



$C_7H_7ClNO_2SNa$

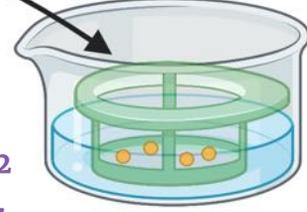
Répéter les étapes 2 et 3 une fois.

Étape 4. Immerger dans de l'eau distillée stérile. Agiter doucement pendant 5 minutes en changeant l'eau deux fois. Jeter le liquide.



H_2O

Étape 5. Immerger dans une solution d'antibiotiques streptomycine et gentamicine (0.2 ml / 10 ml solution mère*) Agiter doucement pendant 2 minutes.



$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$
 $C_{21}H_{43}N_5O_7$

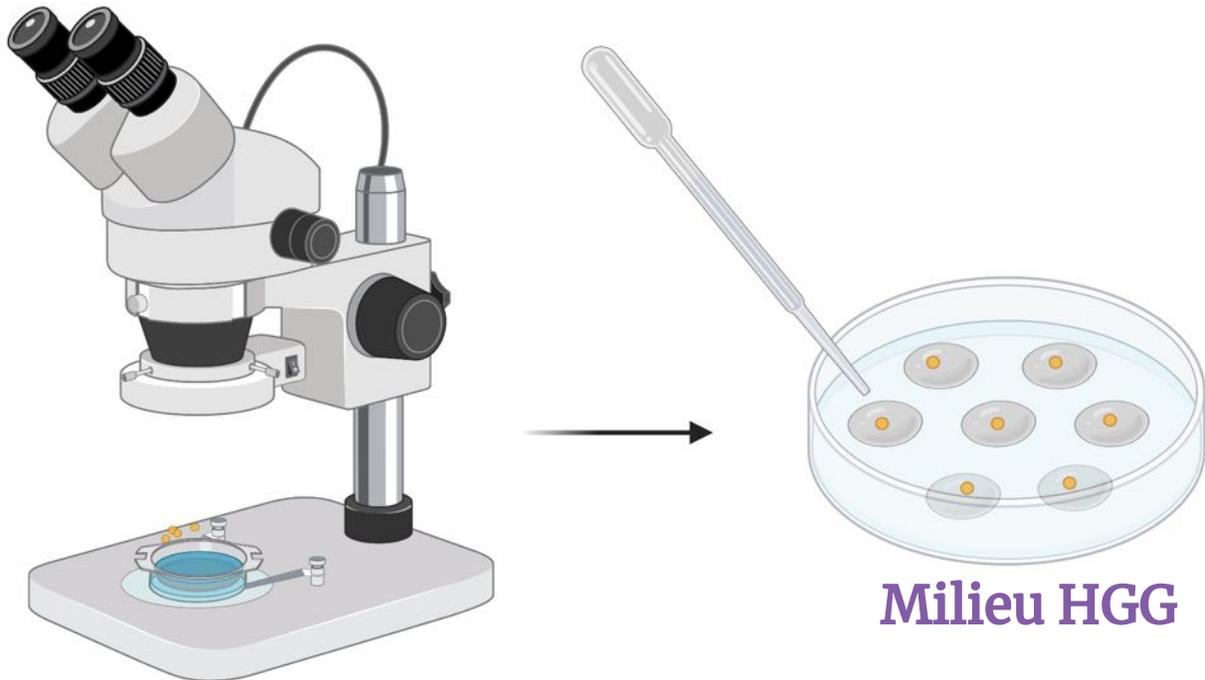
* Streptomycine solution mère: 0.2 g / 20 ml
Gentamicine solution mère: 0.1 g / 20 ml

Références :

- Bécard G and Fortin JA (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* 108, 211-218.
Declerck S, Strullu D-G and Fortin JA. (2005). *In Vitro Culture of Mycorrhizas*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 388 p.

Protocole 7 : Stériliser des spores (partie 2)

Étape 6. Transférer les spores avec une gouttelette d'antibiotiques une par une dans une boîte de Petri avec milieu Hydraté Gellan Gum (HGG), pH 7. Lorsque les gouttelettes se sont évaporées, fermer les boîtes et incuber à la noirceur à 26°C avec 2.5% de CO₂. **Vérifier les boîtes chaque jour et s'il y a des contaminants, les enlever rapidement.**



Étape 7. Dès qu'une spore germe, la transférer sur un milieu de culture Modifié Strullu et Romand (MSR) et placer des morceaux de racines autour de la spore. Incuber la boîte de Petri à 26°C à l'obscurité.

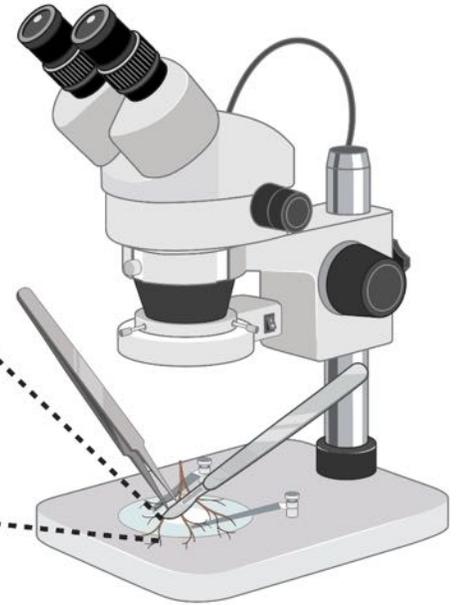
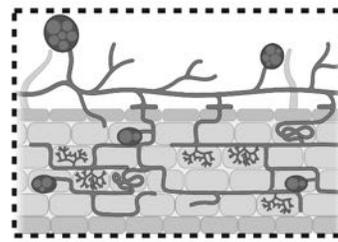


Le morceau de gélose avec la spore doit être placé à l'envers sur le milieu de culture en prenant soin de ne pas endommager la spore ou les hyphes de germination.



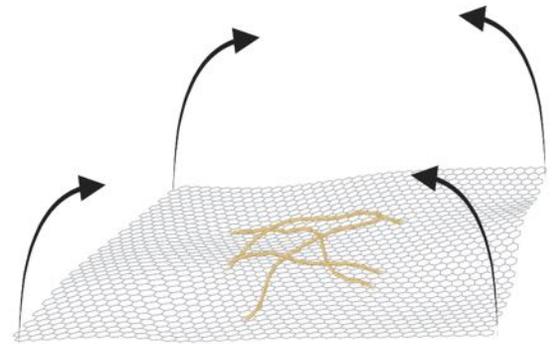
Protocole 8 : Stériliser des racines contenant des vésicules (partie 1)

Étape 1. Choisir des racines saines avec des vésicules visibles. Nettoyer les racines, enlever les débris et parties de racines endommagées. Idéalement, stériliser les racines immédiatement. Sinon elles peuvent être réfrigérées au plus 24 heures.



Étape 2. À partir d'ici, toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stérilisés sous une hotte à flux laminaire.

Placer les racines dans un filet de nylon (100 µm). Plier les rebords pour créer une enveloppe avec les racines à l'intérieur.



Étape 3. Déposer le filet de nylon plié à l'intérieur d'une cassette d'histologie.



Étape 4. Immerger la cassette dans de l'eau distillée stérile. Agiter doucement pendant 5 minutes en changeant l'eau deux fois. Jeter le liquide.

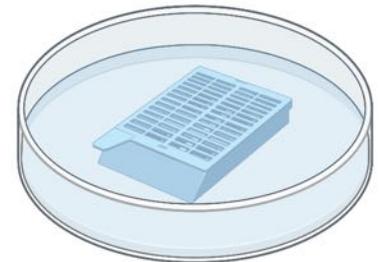


H₂O

Protocole 8 : Stériliser des racines contenant des vésicules (partie 2)

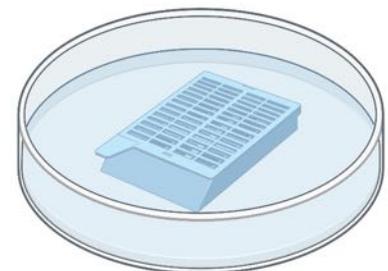
Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

Étape 5. Immerger dans de l'Éthanol 95% pour 10 secondes. Jeter le liquide.



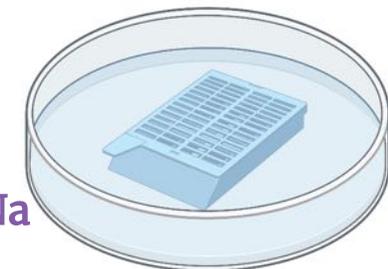
Étape 6. Répéter l'étape 4 (rinçage à l'eau distillée).

Étape 7. Immerger dans une solution fraîche d'hypochlorite de calcium 6%, préalablement filtrée. Agiter doucement pendant 1 minute. Jeter le liquide.



Étape 8. Répéter l'étape 4 (rinçage à l'eau distillée).

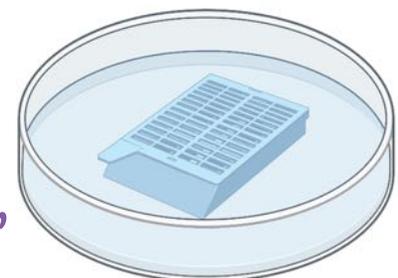
Étape 9. Immerger dans une solution de Chloramine T 2% avec 1-2 gouttes de Tween. Agiter doucement pendant 5 minutes. Jeter le liquide.



Étape 10. Répéter l'étape 4 (rinçage à l'eau distillée).

Étape 11. Répéter les étapes 9 & 10 (Chloramine T + eau distillée).

Étape 12. Immerger dans une solution d'antibiotiques streptomycine et gentamicine (0.2 ml / 10 ml solution mère*). Agiter doucement pendant 6 minutes.

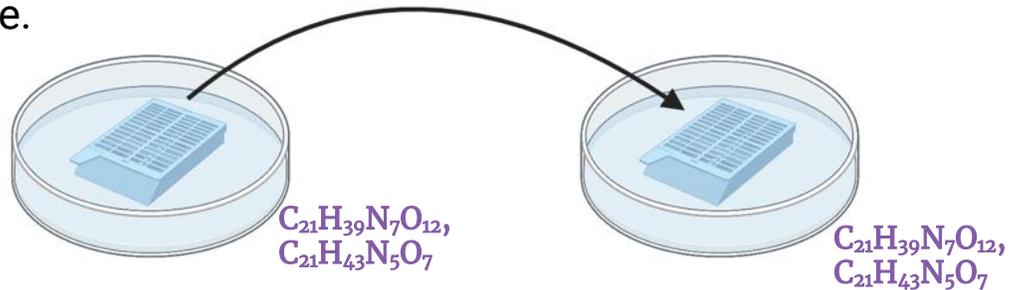


* Solution mère de streptomycine : 0.2 g / 20 ml
Solution mère de gentamicine : 0.1 g / 20 ml

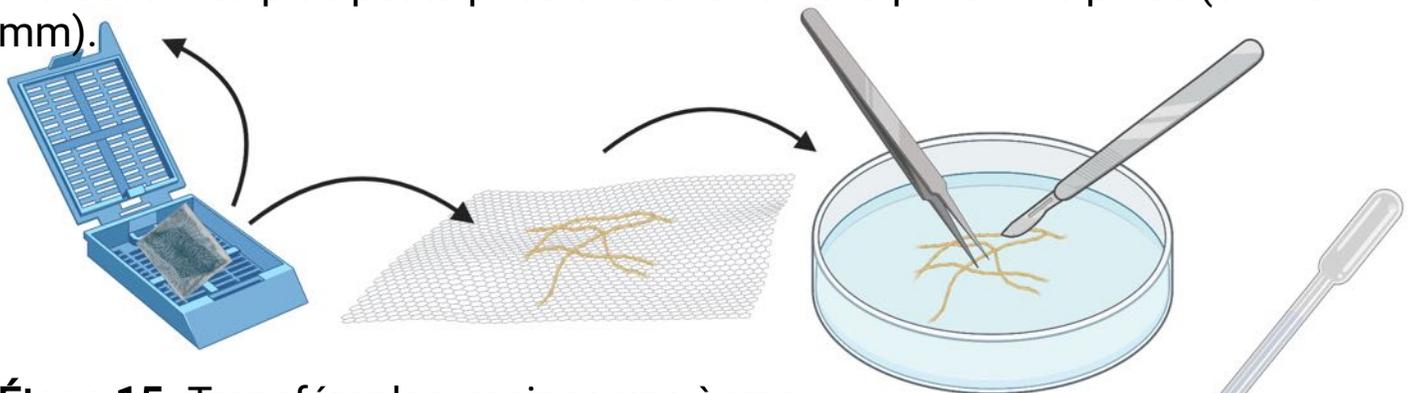
Protocole 8 : Stériliser des racines contenant des vésicules (partie 3)

Toutes les manipulations sont effectuées avec des outils stériles dans une hotte à flux laminaire.

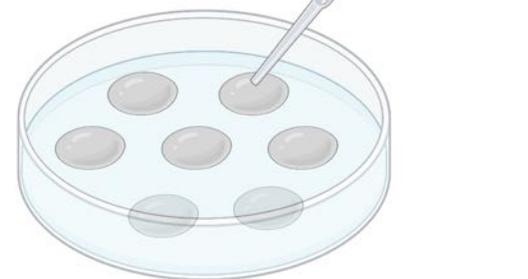
Étape 13. Déposer la cassette dans une boîte de Petri contenant une solution d'antibiotiques fraîche.



Étape 14. Ouvrir la cassette, sortir les racines. Couper les racines en morceaux les plus petits possibles avec un scalpel et une pince (environ 1-2 mm).



Étape 15. Transférer les racines une à une avec une goutte d'antibiotiques sur le milieu de culture Hydraté Gellan Gum (HGG), pH 7. Lorsque les gouttelettes se sont évaporées, fermer les boîtes de Petri et incuber à 26°C avec 2.5% de CO₂ à l'obscurité. **Vérifier les cultures quotidiennement et éliminer rapidement les contaminants.**



Milieu HGG

Étape 16. Dès qu'une vésicule germe, la transférer sur un milieu de culture Modifié Strullu et Romand (MSR) et placer des morceaux de culture de racines monoxéniques autour de la racine stérilisée. Incuber à 26°C à l'obscurité.



Milieu MSR



Le morceau de gélose contenant la racine avec la vésicule qui germe doit être placé à l'envers sur le milieu de culture en prenant soin de ne pas endommager les vésicules ou les hyphes de germination.