

## ANATOMIE ET ÉCOLOGIE FONCTIONNELLES DES PLANTES SUPÉRIEURES TRAVAUX PRATIQUES

### TP4 – Structure des tissus foliaires : bioindication du stress biotique et abiotique

#### Introduction

Ce TP est consacré aux effets du stress biotique et abiotique et aux réponses des végétaux supérieurs. C'est le domaine de la **bioindication**, une discipline importante dans la perspective d'une compréhension approfondie des interactions plantes-environnement. Dernier de la liste, ce TP développe donc de manière systématique des notions abordées précédemment, notamment lors du TP3. L'article de synthèse en annexe<sup>1</sup> passe en revue différents types d'altérations structurales et leurs causes environnementales et fait le lien avec les changements physiologiques à l'origine des altérations structurales constatées. Il sert de base scientifique à ce TP.

Le matériel à disposition fournit des exemples de changements structuraux causés par trois types de facteurs de stress dans les organes foliaires de 4 espèces d'arbres différentes :

- stress biotique : infection fongique chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*) par le champignon ascomycète parasite *Rhabdocline pseudotsugae*
- stress biotique : infestation de pucerons chez le chêne (*Quercus robur*, *petraea* & *pubescens*)
- stress abiotique : dégâts d'ozone dans des aiguilles de pin ponderosa (*Pinus ponderosa*) prélevées dans les montagnes (San Bernardino Mountains) surplombant Los Angeles (USA)
- stress abiotique : dégâts d'ozone dans des feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica*) provenant d'une expérimentation en forêt sur les effets de l'ozone (CASIROZ)

Ces facteurs de stress ont occasionné non seulement des symptômes microscopiques mais aussi des altérations du feuillage visibles à l'œil nu ou avec une loupe/Nurugo (symptômes visibles). Des branches symptomatiques ainsi qu'une documentation sous la forme de photos ou de posters illustrant les symptômes visibles sont fournies pour chaque type de matériel. Sur cette base, il conviendra d'analyser la relation entre la localisation des symptômes et le mode de pénétration ou de développement de l'agent stressant incriminé et d'analyser la contribution des différentes modifications structurales aux caractéristiques morphologiques des symptômes visibles.

Pour effectuer les observations nécessaires dans ce TP, il est nécessaire d'utiliser toute la gamme d'objectifs à disposition sur les microscopes et ainsi d'observer dans le détail la morphologie des tissus et des cellules (cf. TP 3). Quelques micrographies sont fournies pour chaque type de facteur de stress qu'il conviendra de compléter avec des photos macros (Nurugos) et des micrographies personnelles (caméra digitale et téléphone portable monté sur adaptateur) illustrant les détails structuraux (avec barre d'échelle). Enfin, des micrographies de microscopie électronique - à légender pendant le TP - permettent d'illustrer les changements ultrastructuraux en réponse à du stress oxydant (causé par l'absorption d'ozone dans les deux cas illustrés).

<sup>1</sup> Günthardt-Goerg, M.S. and Vollenweider, P., 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Env. Poll.* 147: 467-488.

## Objectifs

- Observer, comparer et comprendre la structure foliaire dans les zones asymptomatiques et symptomatiques.
- Analyser les changements structuraux (observations macro, microscopie photonique, MP) et ultrastructuraux (microscopie électronique à transmission, MET) et en déduire les modifications physiologiques causées par le facteur de stress responsable.
- Comparer la structure et la distribution des symptômes micro- et macro-morphologiques et analyser la contribution des différentes composantes structurales à l'expression des symptômes visibles.
- Comparer les altérations structurales causées par les différents facteurs de stress : identifier les critères diagnostiques, aussi sur la base de l'article fourni.

## Matériel fournis

- des branches d'arbres avec des symptômes biotiques ou abiotiques
- Des coupes semi-fines (2 µm) colorées avec du bleu de toluidine / fuchsine acide et montrant pour les espèces suivantes des secteurs avec et sans symptômes ainsi que différentes caractéristiques structurales:
  - Aiguilles de sapin douglas (*Pseudotsuga menziesii*) infectées par le champignon ascomycète parasite *Rhabdocline pseudotsugae*.
  - Feuilles de chênes (*Quercus pubescens*) asymptomatiques ou présentant des altérations structurales dans le limbe et les nervures suite à une infestation par des pucerons (*Aphidoidea*).
  - Aiguilles de pin ponderosa (*Pinus ponderosa*) prélevées dans la région de Los Angeles, USA, et montrant des symptômes visibles et microscopiques typiques pour l'ozone.
  - Feuilles de hêtre (*Fagus sylvatica*) provenant d'une expérimentation allemande sur les effets de l'ozone (CASIROZ) et montrant des symptômes visibles et microscopiques typiques pour l'ozone.

!!! Matériel de recherche, s.v.p., veuillez manier les lames avec soin !!!

- Une documentation complémentaire sur les symptômes visibles sous la forme de photos, de posters ou d'extraits de publications (voir sous résultats).
- 4-5 Micrographies digitales (MP & MET) par type de matériel
- 1 catalogue des micrographies fournies

## Méthode

- Observations : examiner d'abord les symptômes visibles et leur distribution sur les échantillons frais fournis. Documenter les observations avec des photos macro (Nurugo).
- Passer aux préparations permanentes et commencer par observer une lame asymptomatique ou une zone moins affectée de l'échantillon (*Pinus ponderosa*) et identifier les tissus, les types cellulaires et les organelles visibles en microscopie photonique. Se familiariser avec les caractéristiques du tissu asymptomatique. Passer ensuite à une zone symptomatique et procéder de façon similaire. Identifier toutes les modifications structurales de la cellule au tissu et repérer la distribution des symptômes à l'échelle de la cellule, du tissu et de l'organe foliaire. Comparer les résultats obtenus avec la documentation sur les symptômes visibles et déduire les correspondances entre les symptômes microscopiques et les symptômes visibles. Documentation des observations : tracer un schéma des tissus en utilisant la clé de symboles du document de cours 3/29. Faire la synthèse des observations sous la forme d'un protocole d'observation. Annoter les micrographies fournies (identification des tissus et des changements structuraux). Compléter les illustrations à disposition avec des photos des micrographies personnelles (caméra digitale sur microscope, avec barre d'échelle / téléphone portable monté sur adaptateur).
- Analyse des micrographies en microscopie électronique : identifier les organelles et les structures sub-cellulaires dans les micrographies MET, préparer une légende et analyser les changements ultrastructuraux en réaction au stress oxydant.

## Résultats

Les paragraphes ci-dessous détaillent les observations spécifiques recommandées pour chaque type de préparation.

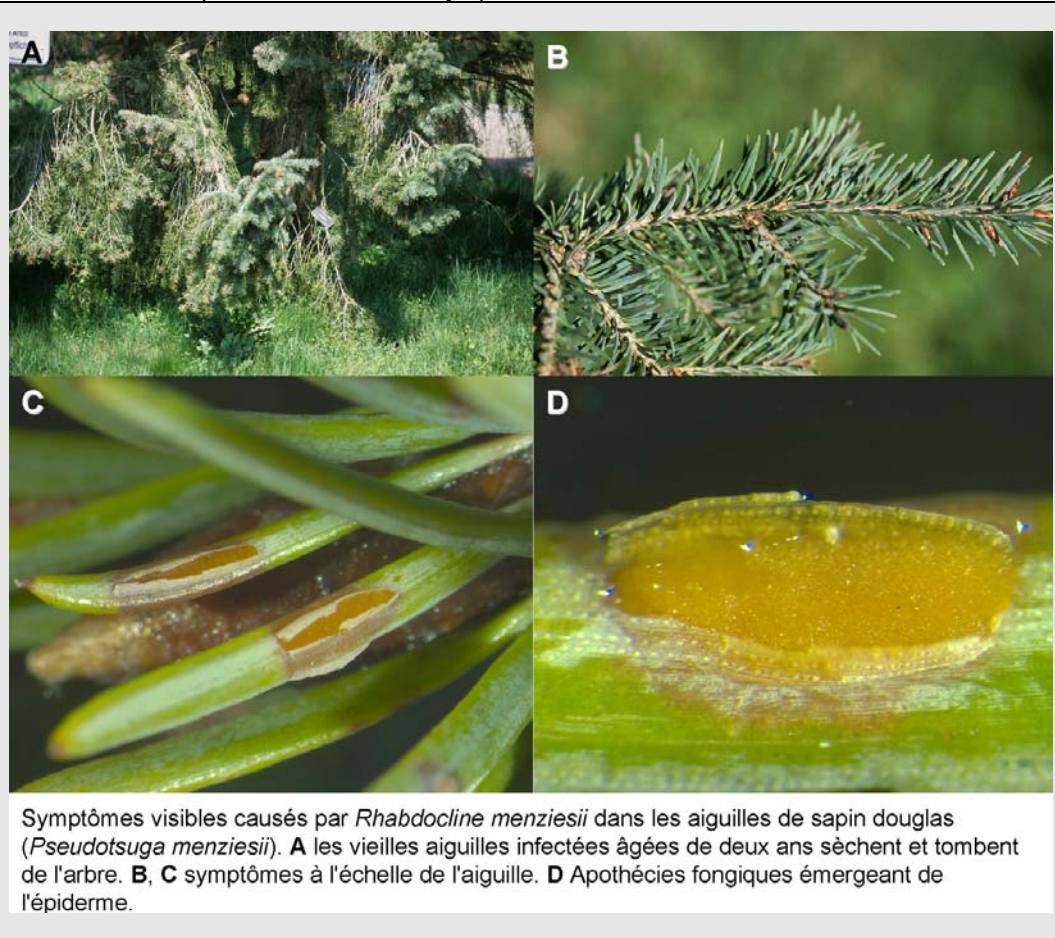
### Les résultats attendus comprennent :

- une documentation macro des symptômes visibles dans le feuillage des échantillons frais fournis
- un schéma histologique des préparations observées
- un protocole d'observations
- une synthèse des critères diagnostiques macro- et microscopiques, sous la forme d'un tableau comparatif pour les différents types de préparation
- des micrographies annotées
- des photos macros et des micrographies personnelles.

Chaque groupe observe l'ensemble du matériel fourni (=> au sein de chaque groupe, répartition du travail en début de séance de TP et communication ensuite des résultats).

### Infection fongique à *Rhabdocline pseudotsugae*

Informations complémentaires sur les symptômes visibles:



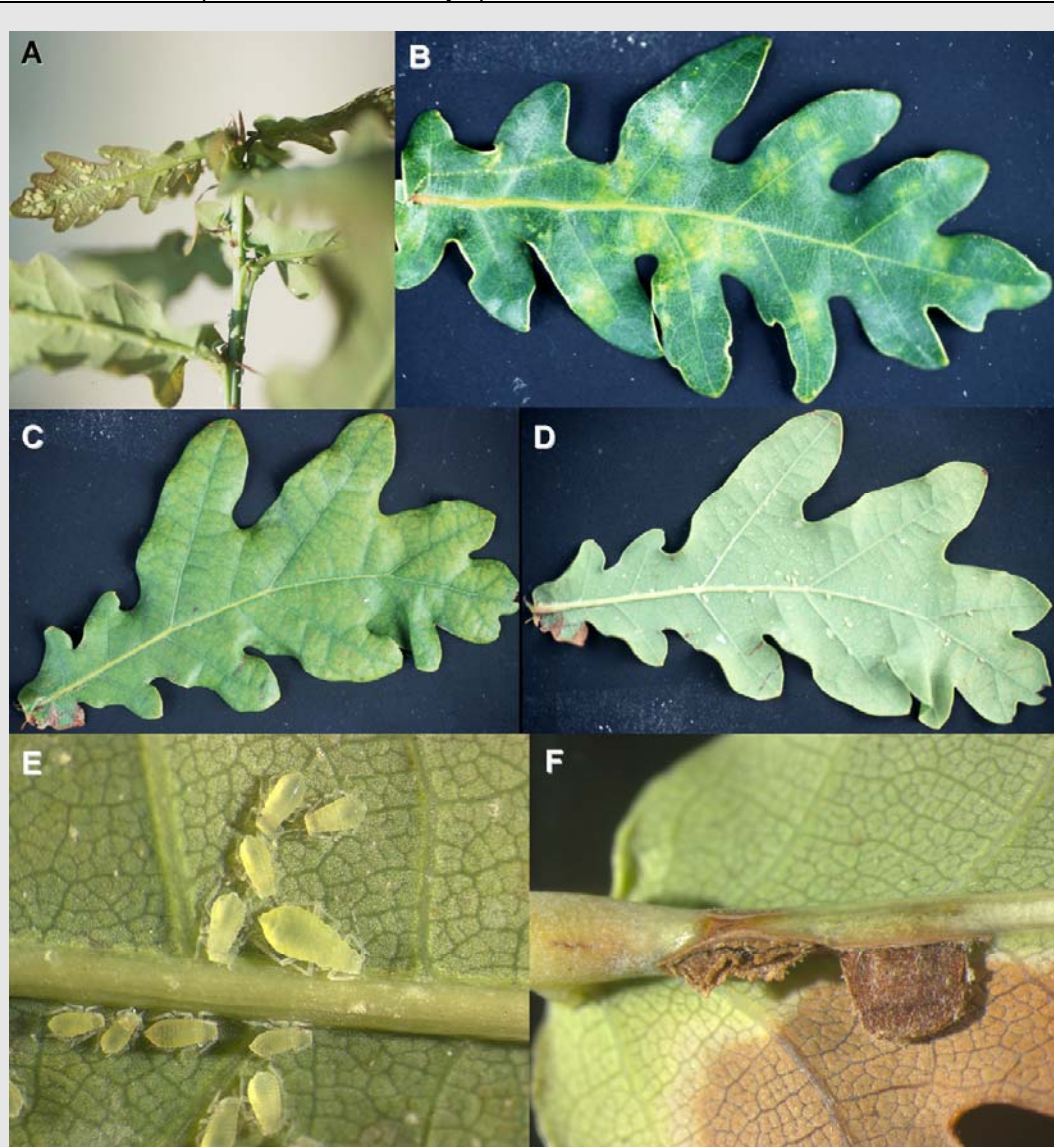
- Compréhension de la structure foliaire: repérer les tissus, les cellules et les structures sub-cellulaires selon les instructions données ci-dessus. Identifier la partie ad- (face supérieure) et abaxiale (face inférieure) de l'aiguille.

- Repérer la zone infectée et les différences de structure avec le secteur moins symptomatique. Différencier les tissus fongiques et foliaires et relever les altérations structurales causées par l'infection fongique. Repérer le mycelium végétatif et les ascospores reproductrices. Identifier les réactions de défense de l'aiguille dans les secteurs avec et sans contamination. Établir une liste de critères diagnostiques.



## Infestation de pucerons

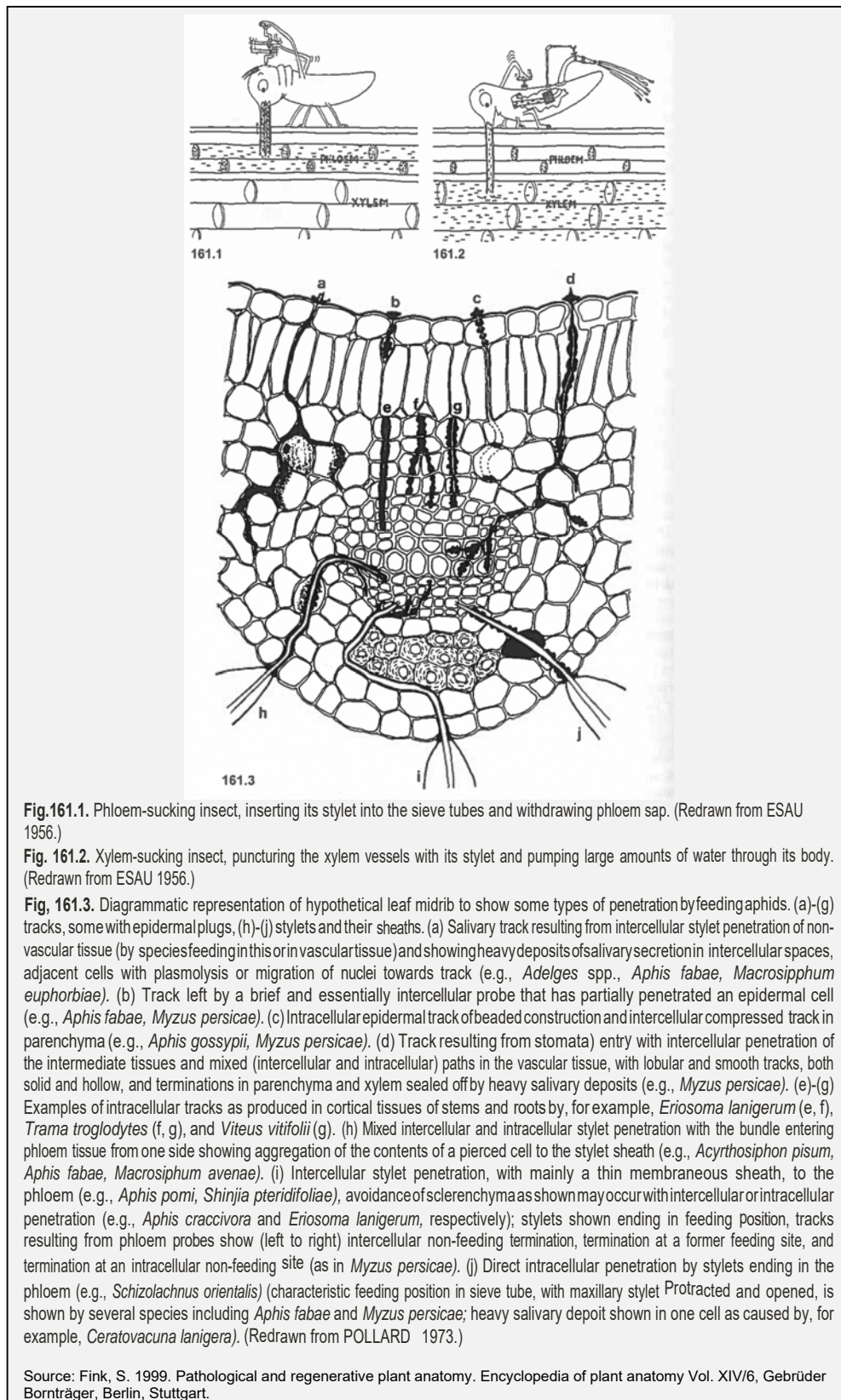
Informations complémentaires sur les symptômes visibles:



Symptômes visibles causés par des pucerons dans des feuilles de chêne (*Quercus robur*). **A, D, E** les pucerons forment des colonies sur les jeunes rameaux et les feuilles, particulièrement les plus jeunes d'entre elles en phase d'expansion. Les insectes se nourrissent de la sève phloémienne en insérant leur rostre dans des nervures de grosseur variable, apparemment choisies en fonction de la taille-même de l'insecte. **B, C** L'infestation cause le développement de symptômes visibles avec une morphologie variable en fonction de l'intensité de l'infestation et de l'état physiologique de l'organe concerné. Ces symptômes évoluent au cours de la saison de végétation en fonction des conditions environnementales. **F** en réaction aux blessures causées par la perforation des veines, les nervures développent des tissus cicatriciels riches en composés de défense oxydés (en brun).

- Compréhension de la structure foliaire: repérer les tissus, les cellules et les structures sub-cellulaires selon les instructions données ci-dessus.
- Repérer les altérations résultant directement (nervures) ou indirectement (limbe) de l'activité des pucerons. Observer les réactions de défense notamment l'obstruction de l'espace inter-cellulaire par des gels mucilagineux (composition : pectines, polysaccharides, restes cellulaires) suite à la libération des contenus vacuolaires épidermiques et à la rupture de la paroi cellulaire abaxiale interne. Observer la variabilité des symptômes dans la feuille. Établir une liste de critères diagnostiques.
- Observer les détails structuraux suivants :

*nervure* : altération du complexe tube criblé-cellule compagne / réactions de défense dans les parenchymes / obstructions polysaccharidiques dans le xylème  
*limbe* : perforation des épidermes / épanchement des substances épidermiques / sénescence accélérée des cellules du mésophile.






## Symptômes d'ozone chez le pin ponderosa

Informations complémentaires sur les symptômes visibles:

### Structural Changes in Ponderosa Pine Needles Exposed to High Ozone Concentrations in the San Bernardino Mountains near Los Angeles, California

Pierre Vollenweider<sup>1\*</sup>, Andrzej Bytnerowicz<sup>2</sup>, Mark Fenn<sup>2</sup>, Terry Menard<sup>1</sup>, Madeleine S. Günthard-Goerg<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf, Switzerland  
<sup>2</sup>USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Riverside, CA, USA  
 \*Presenting author E-mail: pierre.vollenweider@wsl.ch

11:00 am  05:00 pm

#### Introduction

➔ **Background:** with AOT40 currently reaching 75 ppm-h, current levels of ozone pollution in the San Bernardino mountains (SBM) are the highest reported for mountain areas in North America and Europe. During a field trip to the SBM at the occasion of the 22nd biannual meeting of IUFRO subgroup 7.01 (Riverside CA, September 2006), we observed characteristic visible ozone injury in needles of ponderosa pines growing in the western range of SBM and sampled material for microscopical analysis.

➔ **Aims:** 1) To document the structural injury underlying visible symptoms. 2) To validate the initial ozone diagnosis using structural and ultrastructural methods.


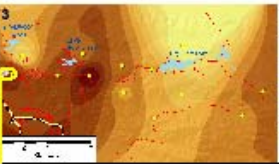
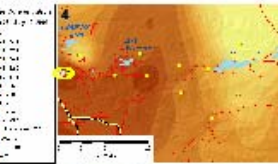
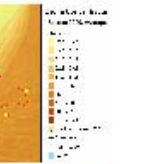
#### Material and Methods

**Experimental site:** The study site is located at 1600 m a.s.l. in a disturbed mixed conifer stand [2] on a western aspect close to Camp Palivikla (CP), a long-term air pollution/forest health monitoring station [1]. It is representative of the upper San Geronimo mountains ecological subregion (M262zh).

**Ozone pollution:** in 2006, CP and other western sites experienced the severest ozone pollution recorded in the SBM considering the highest concentration period [3] as well as the season average [4].


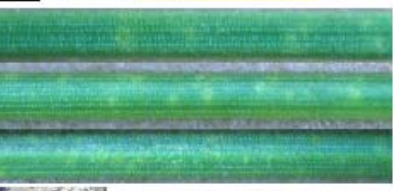
**Sampling:** After documenting visible injury, needle segments were trimmed and fixed for analysis in light (LM) and transmitted electron (TEM) microscopy.

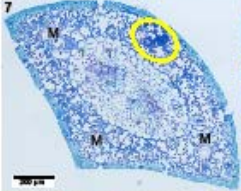
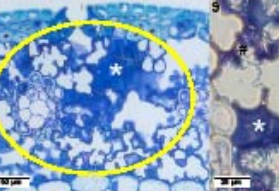

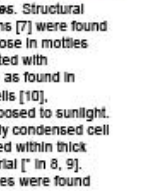
**Sample processing:** 50 µm, 2 µm and 70 nm thick serialised sections were processed, stained and analyzed focusing on structural changes inside and outside mottles.

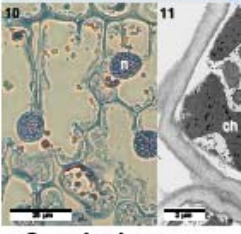
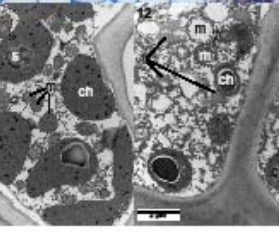
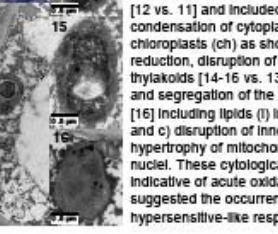
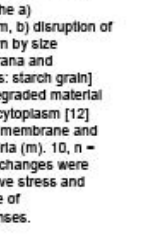
#### Results

➔ **Visible symptoms.** Needle injury, in the form of small mottles densely speckling the needle segments exposed to direct sunlight, was observed on current year needles [5] of most ponderosa pines with accessible branches at the study site. Under a hand lens, mottles characteristically showed up as light green dots with diffuse edges [6]. The surrounding light-exposed tissues were slightly discolored too (photobleaching). Older needles showed necrotic dots with sharp edges, which were also observed at other sites in the SBM (not shown).

➔ **Microscopical changes.** Structural changes in needle sections [7] were found in mesophyll (M) only. Those in mottles [circle in 7 and 8] contrasted with progressive degeneration as found in surrounding mesophyll cells [10], especially those more exposed to sunlight. In mottles, cells with highly condensed cell content [8 in 9] were buried within thick deposits of cell wall material [8 in 9]. Sizable cytological changes were found [12 vs. 11] and included the a) condensation of cytoplasm, b) disruption of chloroplasts (ch) as shown by size reduction, disruption of grana and thylakoids [14-16 vs. 13; s: starch grain] and segregation of the degraded material [16] including lipids (l) in cytoplasm [12] and c) disruption of inner membrane and hypertrophy of mitochondria (m). 10, n = nuclei. These cytological changes were indicative of acute oxidative stress and suggested the occurrence of hypersensitive-like responses.

#### Conclusions


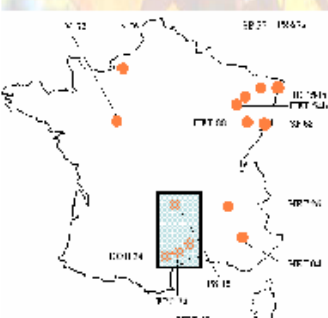
- ✓ In the western SBM, typical structural markers of acute ozone stress underlying little obvious visible injury were found in current year needles of ponderosa pines, as the likely consequence of still very high ozone concentrations. Structural changes in mottles are largely unprecedented.
- ✓ The consequences of the sizable injuries, especially those detected in mottled mesophyll, for needle gas exchange and their development into more conspicuous visible symptoms in older needles need further investigation.

*Acknowledgments: we thank the Center for Microscopy and Image Analysis (ZMB) of the university of Zuerich for the TEM facilities and technical assistance.*

- Compréhension de la structure foliaire: repérer les tissus, les cellules et les structures sub-cellulaires selon les instructions données ci-dessus.
- Repérer la distribution caractéristique des symptômes (mottle) à l'échelle de l'aiguille et du mésophylle. Noter l'absence de pathogènes ou de dégâts dans la nervure. Établir une liste de critères diagnostiques.
- Observer les détails structuraux suivants : accumulation de matériel pariétal dans l'espace intercellulaire (essentiellement des pectines) / épaississement massif des parois cellulaires / déstructuration du protoplasme / accumulation de vésicules / dégradation des chloroplastes jusqu'à une quasi-disparition / condensation et déformation des noyaux.
- Observations en microscopie électronique : voir plus loin.

## Symptômes d'ozone chez le hêtre


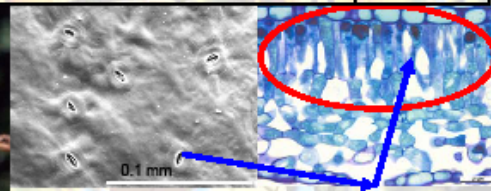
Informations complémentaires sur les symptômes visibles:

### Symptômes d'ozone dans le feuillage des hêtres des sites RENECOFOR


M.S. Günthardt-Goerg<sup>1</sup>, P. Vollenweider<sup>1</sup>, T. Menard<sup>1</sup>, N. Vas<sup>2</sup>, L. Dalstein<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Institut Fédéral de Recherches WSL, Zürcherstrasse 111, CH-8903 Birmensdorf ZH, Suisse, [madeleine.goerg@wsl.ch](mailto:madeleine.goerg@wsl.ch); [pierre.vollenweider@wsl.ch](mailto:pierre.vollenweider@wsl.ch)  
<sup>2</sup>Groupe International d'Etudes des Forêts Sud-Européennes (GIEFS), 69, avenue des Hespérides, F-06300 Nice, [ldalstein@aol.com](mailto:ldalstein@aol.com)

Hêtre avec symptômes d'ozone échantillonné dans des placettes RENECOFOR	
• placette ☉ clairière	effet du à O <sub>3</sub>
• HET 26 (2006), HET 04 (2004), SP 57 (2005), ☉ HET 54a,b (2005)	effet faible
• SP 68 (2001), ☉ PM 72 (2004), PS 67a (2002, 2004), HET 54a (2004)	ozone + infections
• PS 76 (2002), ☉ Het 88 (2005)	effet atypique
• Het 30 (2005, 2006), ☉ Het 30 (2001, 2004), Dou 34 (2006), EPC 34 (2006), PS 15 (2006)	effet typique
☉ PS15 (2004, 2005)	effet typique + sécheresse

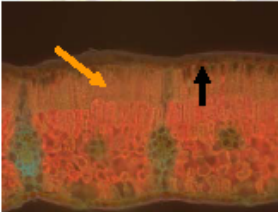



**Symptômes foliaires visibles à l'oeil:** → décoloration des parties exposées à la lumière, chlorose (effet faible) → bronzage (effet typique) points brunâtres (necrose)

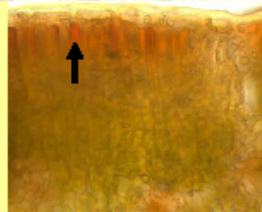
**L'ozone entre à l'intérieur des feuilles par les stomates (ainsi que le CO<sub>2</sub>). Finalement, il est responsable de la mort programmée de groupes de cellules assimilatrices.**



Symptômes dus à l'ozone à la surface des feuilles de hêtre, de gauche à droite, léger et fort bronzage en 2005 et en 2006.



Chlorose (→ dégénérescence des chloroplastes, perte d'auto fluorescence). Bronzage (→ augmentation de la concentration et de l'oxydation des tannins, particulièrement dans la partie apicale des cellules assimilatrices). Nécrose (mort programmée de groupes de cellules assimilatrices, → voir ○ en haut)



- Compréhension de la structure foliaire: repérer les tissus, les cellules et les structures sub-cellulaires selon les instructions données ci-dessus.
- Repérer la distribution caractéristique des symptômes d'ozone à l'échelle de la feuille et dans les parties ad- et abaxiale. Noter l'absence de pathogènes ou de dégâts dans les nervures. Observer la variabilité des symptômes microscopiques. En vous aidant de l'article fourni, repérer les réactions de type « sénescence accélérée » et « réponse hypersensible ». Établir une liste de critères diagnostiques.
- Observer les détails structuraux suivants : gradients de symptômes entre les parties ad- et abaxiales / intensité variable des symptômes dans le parenchyme palissadique, îlots fortement symptomatiques intercostaux / accumulation de composés de défense dans les

cellules (tannins condensés) / réduction de la taille des chloroplastes / augmentation de la taille des plastoglobules dans les chloroplastes.

- Observations en microscopie électronique : voir plus loin.



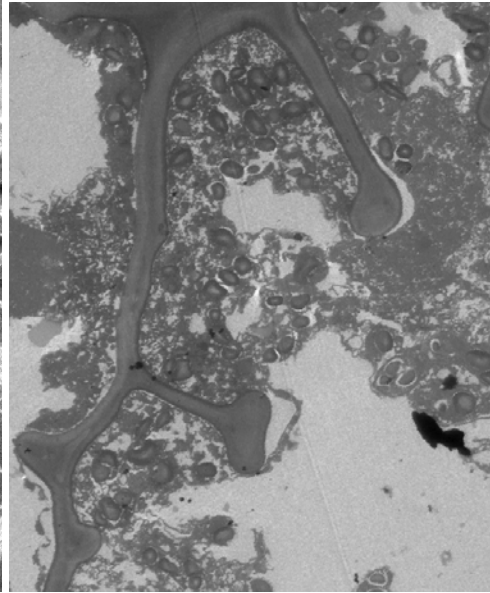
### Microscopie électronique

Changements ultrastructuraux en réponse à du stress oxydant induit par l'ozone : comparaison de la structures des cellules symptomatiques et asymptomatiques dans le mésophylle des aiguilles de pin ponderosa et des feuilles de hêtre.

Pin Ponderosa

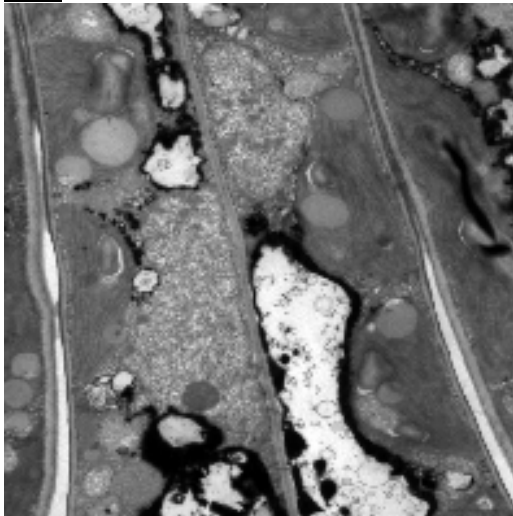


asymptomatique

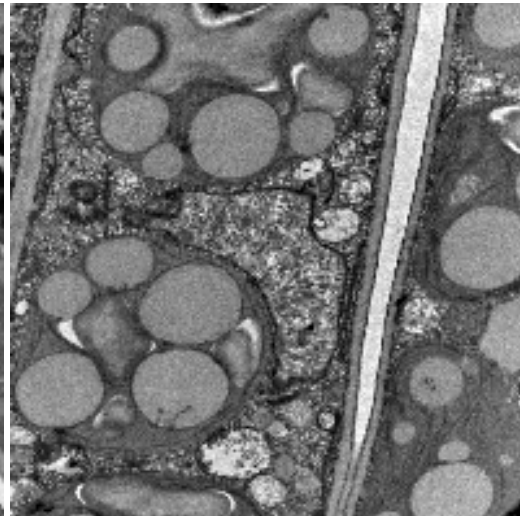


symptomatique

hêtre



asymptomatique



symptomatique

- identifier les organelles
- identifier chaque structure et légender les micrographies
- résumer dans un tableau les caractéristiques structurales normales et leur modification dans les échantillons symptomatiques.