



Évaluation de méthodes de production de semis résineux mycorhizés par des champignons ectomycorhiziens à valeur commerciale

Les mycorhizes sont des associations symbiotiques entre un champignon et une plante vasculaire ou une bryophyte. Le fruit de cette association procure des avantages multiples, à la fois à la plante vasculaire et au champignon. Certains champignons ectomycorhiziens (EC) sont comestibles et à valeur commerciale, par exemple des bolets ou cèpes (*Boletus*), des chanterelles (*Cantharellus*) et des lactaires (*Lactarius*). Or, la récolte de champignons forestiers à valeur commerciale représente un intérêt grandissant pour les amateurs de produits forestiers non ligneux (PFNL). La production de plants mycorhizés par des EC suscite donc un vif intérêt, autant pour les pépiniéristes que la filière mycologique.

C'est dans ce contexte qu'a débuté un projet visant à tester plusieurs méthodes pour la production efficace de plants de résineux ectomycorhizés (*Pinus banksiana*, *Pinus koraiensis* et *Picea glauca*) par des champignons à potentiel commercial (*Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus*), dans le but ultime de permettre l'utilisation de cette approche par des pépiniéristes. Ces méthodes permettront d'allier deux avantages complémentaires : stimuler la croissance d'essences arborescentes économiquement intéressantes pour le reboisement ou la production de noix, et la production de champignons recherchés par les consommateurs.

Objectifs

Le projet poursuit deux objectifs principaux :

- 1- Vérifier quelle(s) technique(s) de production de mycélium liquide offre(nt) les meilleurs gains en biomasse de mycélium.
- 2- Comparer en laboratoire le succès de l'inoculation de graines de 3 essences résineuses (figures 1 à 3) par du mycélium liquide de deux champignons EC à valeur commerciale (figures 4 et 5), selon la méthode de production de mycélium liquide qui aura donné les meilleurs résultats.

Le pin gris et l'épinette blanche sont choisis car ce sont des essences indigènes couramment utilisées lors du reboisement des forêts québécoises après coupe. Le pin de Corée quant à lui, est peu cultivé au Québec, mais a été retenu pour son potentiel de production de noix qui intéresse les pépiniéristes.



Figure 1 : Pin gris ou *Pinus banksiana* Lamb.



Figure 2 : Pin de Corée ou *Pinus koraiensis* P. F. von Siebold et J. G. Zuccarini



Figure 3 : Épinette blanche ou *Picea glauca* (Moench) Voss

Pour davantage d'information, consulter :

Rondeau, J., E. Boulfroy, G. Joanisse et G. Lessard. 2021. Évaluation de méthodes de production de plants résineux mycorhizés par des champignons ectomycorhiziens à valeur commerciale. Cégep de Sainte-Foy et Centre d'enseignement et de recherche en foresterie de Sainte-Foy inc. (CERFO). Rapport 2021-09. 52 pages .



Figure 4 : *Boletus chippewaensis* A.H. Sm et Thiers



Figure 5 : *Lactarius deliciosus* (Fries) S.F. Gray

Méthodologie

Comparaison des techniques de production de mycélium liquide

Comme les deux champignons choisis sont à croissance lente, plusieurs milieux de culture ont tout d'abord été testés, afin d'identifier celui qui procurait les meilleurs gains en croissance : PDBY, GYME, MNM. Le temps de croissance des cultures pour ce test était d'une durée de 69 jours pour *Boletus* et 75 jours pour *Lactarius*.

Une fois le milieu de culture choisi, trois modes de production de mycélium liquide ont été évalués : par emporte-pièce, broyé, en suspension. Les principales étapes réalisées pour répondre au premier objectif sont présentées aux figures 6, 7 et 8.

Comparaison des méthodes d'inoculation de mycélium liquide sur des graines d'essences résineuses

Les principales étapes réalisées pour répondre au second objectif sont présentées dans la figure 9. Trois traitements différents d'inoculation ont été effectués. Il était initialement prévu de tester les modes de production de mycélium liquide qui assuraient les meilleurs résultats. Comme la production de mycélium a été compromise en raison du confinement du printemps 2020 lié à la crise sanitaire de la Covid 19

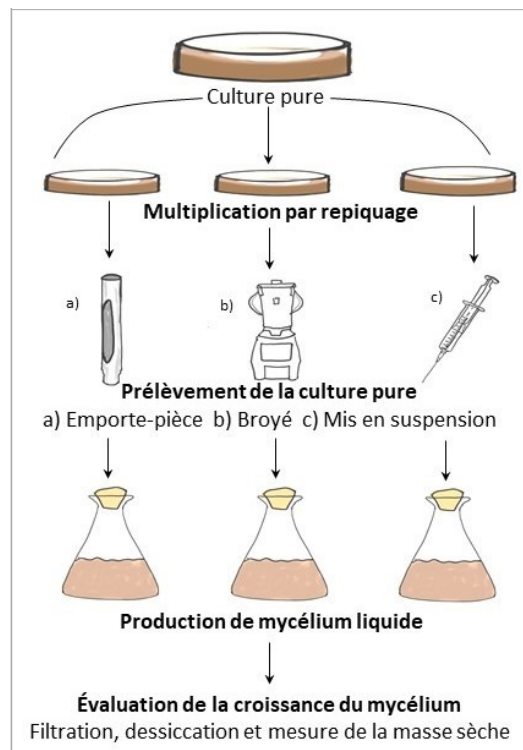


Figure 6 : Étapes pour comparer les méthodes de production de mycélium liquide



Figure 7 : Culture liquide du lactaire selon les 3 méthodes



Figure 8 : Échantillons pesés (masse sèche)

qui a rendu l'accès aux laboratoires impossible pendant 2 mois, il a été décidé d'utiliser un mélange de tous les échantillons de mycélium disponibles (par broyage et emporte-pièce). Les traitements proposés varient alors en fonction du nombre d'inoculations réalisées :

- **1 inoculation** : l'inoculum est mélangé au substrat au moment de la mise en terre des graines (18 juin 2020).
- **2 inoculations** : 1 première dans le substrat et une seconde au stade cotylédons et aiguilles pour la majorité des plants (10 juillet).
- **3 inoculations** : la 3^e a eu lieu 1 mois après la 2^e, soit le 10 août.
- **3 témoins**, avec 1, 2 ou 3 inoculations de milieu de culture sans inoculum.

Le nombre total de propagules viables de mycélium injectées est le même quelque soit le nombre d'inoculation. Il varie entre $1,3 \times 10^9$ et $2,3 \times 10^9$ pour le cèpe et entre $2,6 \times 10^9$ et $3,9 \times 10^9$ pour le lactaire.

Le dispositif expérimental est du type split-split-plot et comprend 4 répétitions de chaque combinaison de traitement (3 nombres d'inoculation et 3 témoins) X essence forestière (pin gris, pin de Corée et épinette blanche) X champignon (bolet et lactaire). Chaque répétition est constituée de 4 alvéoles contenant chacune un semis (figure 10). Le substrat a été pasteurisé deux fois dans un intervalle de 48 heures et est non stérilisé pour permettre une reproduction de la méthode par les pépiniéristes.



Figure 10 : Plants de résineux au moment de la récolte (16 octobre 2020)

Résultats

Croissance des EC sur différents milieux de cultures liquides

Le milieu GYME est nettement le plus performant pour le bolet alors que dans le cas du lactaire, c'est le milieu PDBY qui assure la meilleure croissance, suivi de GYME, qui donne des résultats significativement supérieurs aux témoins (figure 11). **Il a donc été décidé de développer l'inoculum liquide sur milieu GYME pour les deux champignons.**

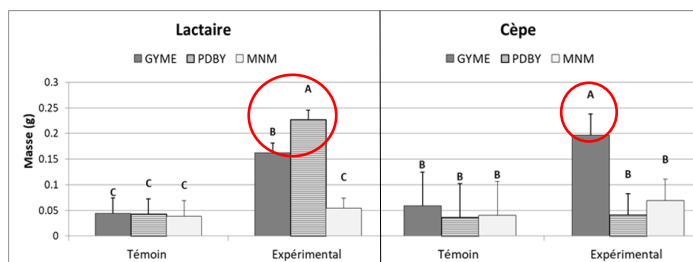


Figure 11 : Masse sèche des milieux témoins et avec EC selon les milieux de culture liquide

Croissance des EC selon différentes méthodes d'inoculation du mycélium

Dans le cas du bolet, les deux milieux Broyé et Emporte-pièce montrent une masse sèche significativement supérieure à celle des témoins. Aucune différence significative entre les 3 types d'inoculation n'est par contre remarquable chez le lactaire (figure 12). **Les modes Broyé et Emporte-pièce sont donc privilégiés pour la production d'inoculum liquide.**

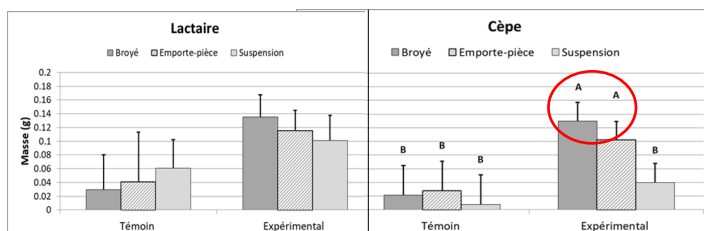


Figure 12 : Masse sèche des milieux témoins et avec EC selon les méthodes d'inoculation du mycélium

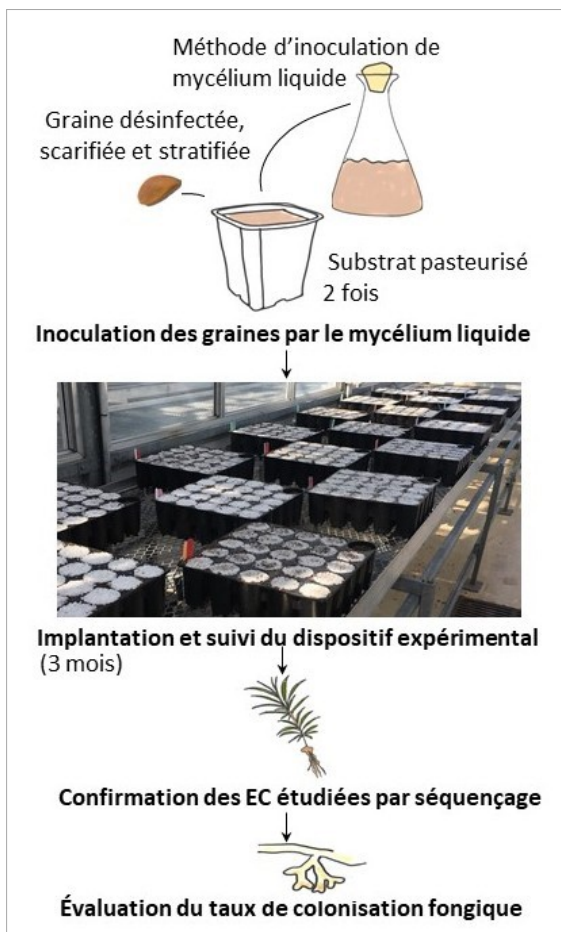


Figure 9 : Étapes pour comparer les méthodes d'inoculation sur des graines de résineux

Présence de mycélium sur les racines des plants résineux

La présence de mycélium sur les carottes de racines de 162 plants a été évaluée à la loupe binoculaire (figure 13).

Pour toutes les espèces : aucune différence significative n'est remarquable entre les plants témoins et les plants inoculés. Même les témoins présentent des traces de mycélium. **On peut donc conclure que le mycélium provient en partie de champignons qui étaient présents dans l'air ambiant de la serre ou dans le substrat utilisé.**

Pin gris : la présence de mycélium est très importante (chez 84% des plants, tous traitements confondus). Le pin gris est donc une espèce qui crée facilement des relations avec des champignons et ce, même à un jeune âge (semis de 4 mois).

Pin de Corée : la présence de mycélium est très marginale (4% des plants). La création de relations avec des champignons EC est donc plus difficile, du moins en jeune âge.

Épinette blanche : la présence de mycélium est d'un niveau intermédiaire entre les 2 pins (28%).



Figure 13 : Observation des racines des plants mycorhizés

Nature des champignons ectomycorhiziens présents

Des séquençages d'ADN ont été réalisés pour identifier la nature des champignons présents, à l'aide d'amorces spécifiques aux basidiomycètes (24 échantillons) d'une part, et aux 2 champignons inoculés (12 échantillons) d'autre part.

Pin gris : les semis ont une présence importante de mycélium de basidiomycètes (10/14 échantillons) : on retrouve principalement *Suillus* (29%) et *Thelephora* (43%) (figure 14).

Pin de Corée : *Suillus* a été identifié sur le seul échantillon testé.

Épinette blanche : *Thelephora* a été identifié sur 4 des 9 échantillons.



Figure 14 : *Thelephora terrestris* Ehrhart (a) et *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze (b)

Présence du lactaire : le séquençage avec amorce spécifique a confirmé que le lactaire n'est pas présent sur les échantillons d'apex racinaire analysés chez aucune des 3 essences forestières (figures 15 et 16). Cela signifie que **la mycorhization du lactaire chez les semis est soit absente, soit très réduite et n'a pu être détectée lors du choix des échantillons séquencés.**

Présence du bolet : la manipulation du séquençage pour détecter le bolet n'a pas abouti à des résultats satisfaisants (absence de témoin positif) et **il n'a pas été possible de confirmer la présence/absence du champignon** dans les échantillons.

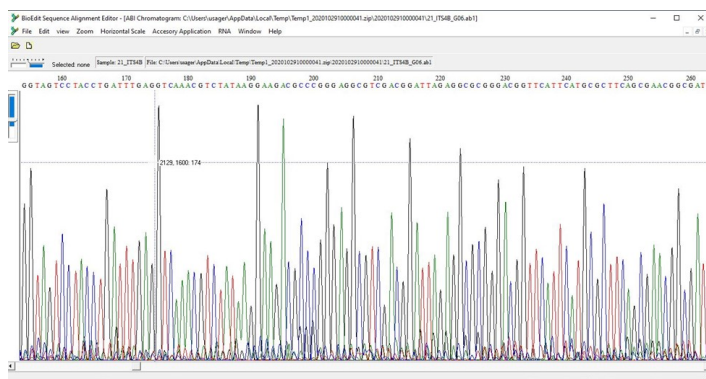


Figure 15 : Exemple des résultats de séquençage d'un échantillon dont l'ADN a été amplifié sur Bioédit

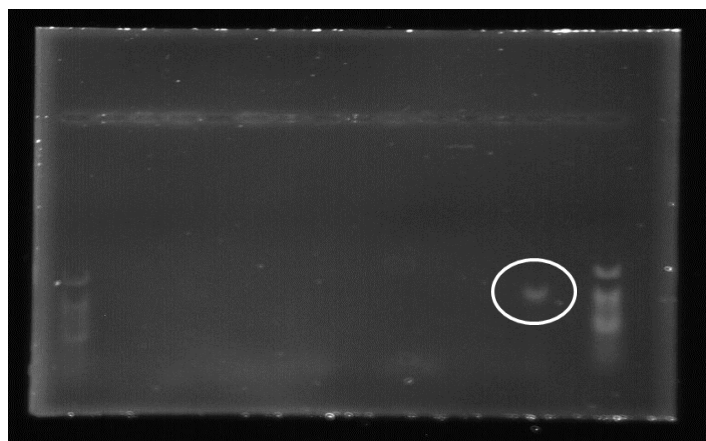


Figure 16 : Résultat de l'électrophorèse des 12 échantillons inoculés avec la souche *L. delicosus* et du témoin positif qui est encerclé (ADN confirmé de *L. delicosus*)

Réponses aux hypothèses

Hypothèse 1 : La croissance du mycélium augmente selon les méthodes de production : *Suspension* < *Emporte-pièce* < *Broyé*

Cette hypothèse est partiellement confirmée pour le bolet (*Suspension* < *Emporte-pièce* = *Broyé*) et n'est pas confirmée pour le lactaire.

Hypothèse 2 : Le taux de colonisation racinaire du mycélium des 2 champignons ectomycorhiziens étudiés chez les semis augmente selon les méthodes d'inoculation suivantes : *1* < *2* < *3 inoculations*

Hypothèse 3 : Le taux de colonisation racinaire du mycélium des 2 champignons étudiés chez les semis augmente selon les espèces suivantes : *Pin de Corée* < *Épinette blanche* < *Pin gris*

Les hypothèses 2 et 3 n'ont pu être validées. Les tests du lactaire ont confirmé qu'il n'était pas présent sur les apex racinaires lors de la récolte des semis. Pour le bolet, les tests de séquençage d'ADN n'ont pas été probants. Cependant, d'autres champignons basidiomycètes ont colonisé les apex racinaires des semis des 3 essences forestières. Ces derniers étaient vraisemblablement présents dans l'environnement ambiant des semis (air, substrat). Le taux de colonisation de ces champignons suit l'ordre croissant énoncé dans l'hypothèse 3.

Plusieurs pistes pourraient expliquer l'absence de mycélium des 2 champignons à l'étude sur les racines des semis :

Absence de compatibilité démontrée entre les champignons et les essences forestières étudiés : des tests de compatibilité selon la méthode de Wong et Fortin (1989) ont été amorcés entre les 2 champignons et les 3 espèces d'arbres. Ils n'ont par contre pu aboutir en raison du confinement qui a entraîné la mort des échantillons. Si une compatibilité entre le pin gris et *Boletus chippewaensis* a déjà été démontré, tout comme celle de *Lactarius deliciosus* avec plusieurs pins, le choix de l'isolat des espèces fongiques est très important et doit être démontré.

Inoculum trop dilué : il se peut que l'inoculum ait été trop dilué pour permettre la croissance d'un mycélium viable. Les faibles concentrations de propagules viables utilisées sont dues aux contraintes liées au confinement, qui a compromis la production d'inoculum.

Méthode de production du mycélium : la culture de mycélium à partir d'inoculum liquide est le type d'inoculation le plus fréquent, ce qui explique ce choix dans le projet. Par contre, l'inoculum liquide a peut-être nui à la viabilité des propagules dans le sol, qui étaient plus susceptibles de sécher que si elles avaient été sous forme solide. L'utilisation d'inoculum liquide non broyé ou solide aurait peut-être augmenté la longévité des propagules dans le substrat.

Croissance très lente des 2 champignons étudiés versus la durée de croissance des semis : le dispositif expérimental s'est déroulé sur 4 mois à cause de la durée du projet limitée à 1 an. En présence de champignons à croissance lente, il se peut que cette période n'ait pas été suffisante pour permettre le développement des 2 champignons.

Croissance très lente des 2 champignons étudiés versus la compétition avec d'autres champignons plus compétitifs : ces 2 champignons sont reconnus pour avoir une croissance beaucoup plus lente que d'autres champignons plus opportunistes, qui se trouvent souvent dans l'environnement ambiant. Il se peut donc que leur croissance ait été tellement lente qu'ils n'ont pas réussi à compétitionner avec eux, ce qui a pu entraîner leur mort.

Équipe de réalisation :

Joëlle Rondeau, M.Sc^a, Emmanuelle Boulfroy, M.Sc^b, Gilles Joannis, biol., Ph.D^b, Guy Lessard, M.Sc^b,

^aCégep de Sainte-Foy

^bCentre d'enseignement et de recherche en foresterie de Sainte-Foy (CERFO)

Un grand merci aux partenaires du projet :

L. Bernier, A. Gagné, J.-G. Catford et F. Larochelle de l'Université Laval ; J.-A. Fortin du Centre d'étude de la forêt ; H. Germain de l'UQTR ; P. Lupien du Syndicat des producteurs de bois de la Mauricie ; M. S. Lamhamedi du MFFP ; M.-O. Harvey de la pépinière Casse-Noisette ; V. Leblanc de Violon et Champignon ; G. Laperrière de Biopterre.

Recommandations

Tester d'autres milieux de production des propagules : il est proposé pour tenter d'accélérer la production des propagules d'ajouter du CO₂ dans le milieu de culture et modifier le type d'agitateur utilisé.

Confirmer la compatibilité entre les champignons et les essences forestières : suite aux échecs des tests de compatibilité réalisés dans le présent projet, et devant l'importance de valider l'existence d'une compatibilité entre le champignon et l'espèce forestière hôte, il serait très judicieux de reprendre ces tests (Wong et Fortin (1989).

Utiliser un milieu de croissance stérile : il a été choisi de pasteuriser et non stériliser le substrat de croissance afin que la méthode soit compatible avec les techniques des pépiniéristes. L'absence de milieu stérile a par contre ouvert la porte à des champignons compétiteurs.

Ajouter dans l'expérimentation un champignon EC qui colonise facilement comme témoin positif comme le *Laccaria bicolor* : ceci permettrait de confirmer que l'absence des 2 champignons étudiés sur les racines des semis n'est pas due à un problème méthodologique.

Tester le mycélium liquide en emporte-pièce ou le mycélium solide pour augmenter la densité des propagules inoculées : d'autres modes d'inoculation que le mycélium broyé permettraient peut-être d'augmenter la durée de vie des propagules, en étant moins sujets à la dessiccation. En saturant davantage le milieu en propagules, cela augmenterait aussi les chances de colonisation des champignons étudiés.

Inoculer quand les plants sont plus développés : des inoculations sur les racines secondaires sont suggérées par certains auteurs.

Vérifier le taux de survie des propagules dans le sol : les propagules étaient viables au moment des inoculations. Aucune donnée de survie des propagules n'a été prise pendant le développement des racines. Cela permettrait de comprendre quand les propagules sont mortes et d'ajuster alors la séquence des traitements d'inoculations.

Allonger la durée de suivi du dispositif : le dispositif en serre n'a pu être suivi que pendant 4 mois. Comme les champignons étudiés sont à croissance lente, il serait pertinent de faire un suivi sur une période plus longue, en particulier si l'on a la preuve que des propagules viables sont présentes. Ceci permettrait aussi d'inoculer des plants plus âgés.

Conclusion

Le projet a permis de documenter 3 modes de production d'inoculum liquide et d'établir lesquels sont plus performants pour *Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus*. L'implantation et le suivi pendant 4 mois d'un dispositif expérimental rigoureux, testant 3 modes d'inoculation de 2 champignons sur 3 essences résineuses (*Pinus banksiana*, *Pinus koraiensis* et *Picea glauca*) n'ont pas apporté de réponses satisfaisantes sur les combinaisons de champignons, essences forestières et méthodes d'inoculation qui permettraient le meilleur taux de colonisation racinaire des semis. Des recommandations sont formulées pour une poursuite éventuelle du projet.

Ainsi, à la lumière des résultats de ce projet, il n'est pas aisé de développer une méthode de production de semis à partir de graines de résineux ectomycorhizés par *Boletus* et *Lactarius*, en conditions non stériles, qui serait alors utilisable par les pépiniéristes.