PROGRAMME D'AIDE À LA RECHERCHE ET AU TRANSFERT – VOLET INNOVATION TECHNOLOGIQUE

Rapport final

ÉVALUATION DE METHODES DE PRODUCTION DE SEMIS DE PLANTS RESINEUX MYCORHIZES PAR DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS A VALEUR COMMERCIALE

Présenté à :

Filière mycologique de la Mauricie

Patrick Lupien, Ing.f.

Par :

Cégep de Sainte-Foy

Joëlle Rondeau

Et

CERFO
Centre d'enseignement et de recherche en foresterie de Sainte-Foy inc.

Emmanuelle Boulfroy, M.Sc.
Gilles Joanisse, biol. Ph.D.
Guy Lessard, ing.f., M.Sc,

Avril 2021

© CERFO 2021-09

Mots-clés : ectomycorhize, mycélium, inoculation, *Boletus*, bolet, *Lactarius*, lactaire, *Pinus banksiana*, pin gris, *Pinus koraiensis*, pin de Corée, *Picea glauca,* épinette blanche, produit forestier non ligneux

Référence à citer :

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.

BÉNÉFICIAIRE DU PROJET

- **Filière mycologique de la Mauricie**
  Patrick Lupien, *ing.f.*
- **Club des producteurs de noix comestibles du Québec**
  Giulio Neri, président

PARTENAIRES DU PROJET

- **Cégep de Sainte-Foy**
  Joëlle Rondeau, professeure en Technique en bioécologie, M. Sc.
  Daniel Dickner, professeur en Technique d'analyses biomédicales
- **Centre d'enseignement et de recherche en foresterie de Sainte-Foy inc. (CERFO)**
  Emmanuelle Boulfroy, M.Sc.
  Gilles Joanisse, biol. Ph.D.
  Guy Lessard, ing.f., M.Sc.
  Antoine Daignault, étudiant en Technique en bioécologie
- **Université Laval**
  Louis Bernier, Ph.D.
  André Gagné, M. Sc.
  Jean-Guy Catford, Ph.D.
  François Larochelle, M.Sc.
- **Centre d'Étude de la Forêt (CEF)**
  J. André Fortin, Ph.D.
- **Université du Québec à Trois-Rivières**
  Hugo Germain, *Ph.D.*
- **Syndicat des producteurs de bois de la Mauricie**
  Patrick Lupien, coordonnateur de la filière mycologique de la Mauricie
- **Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs**
  Mohammed S. Lamhamedi, ing.f., M.Sc., PhD
- **Pépinière Casse-noisette**
  Marc-Olivier Harvey, propriétaire
- **Violon et Champignon**
  Vincent Leblanc, propriétaire
- **Biopterre**
  Geneviève Laperrière

TABLE DES MATIÈRES

BÉNÉFICIAIRE DU PROJET iii

PARTENAIRES DU PROJET iii

LISTE DES FIGURES i

LISTE DES TABLEAUX iii

REMERCIEMENTS iv

RÉSUMÉ v

1. MISE EN CONTEXTE 1

2. OBJECTIFS 2

3. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE 3

3.1. Méthodes de production de mycélium 3

3.2. Association champignons-essences forestières 3

4. MÉTHODOLOGIE 4

4.1. Choix des champignons retenus et confirmation par séquençage 4

4.2. Culture solide de *Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus* 5

4.3. Cultures liquides de *Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus* 7

4.4. Mesures de masse sèche 9

4.5. *Culture de Boletus* chippewaensis et *Lactarius deliciosus* selon la méthode de Wong et Fortin (1988) 10

4.6. Production de l'inoculum liquide de *Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus* et calcul du nombre de propagules viables 12

4.7. Préparation des graines de pins et d'épinettes 14

4.8. Implantation du dispositif expérimental 14

4.9. Culture en serre 22

4.10. Analyse des plants 22

4.11. Analyses statistiques 25

5. RÉSULTATS 26

5.1. Croissance du mycélium de *Boletus* et *Lactarius* en milieux solide et liquide 26

5.2. Vérification de la compatibilité en asepsie entre les champignons et les essences forestières selon la méthode de Wong et Fortin 31

5.3. Analyse du dispositif expérimental 32

5.4. Faits saillants 43

6. DISCUSSION 44

6.1. Méthodes de production de mycélium 44

6.2. Association champignons-essences forestières 44

7. RECOMMANDATIONS 47

8. CONCLUSION 49

9. RÉFÉRENCES 50

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Culture pure de *Boletus chippewaensis* (en haut à gauche) et *Lactarius deliciosus* (en haut à droite), implantation de racines de *Cistus* sur milieu Mw (en bas) 6
Figure 2. Culture liquide de *Boletus chippewaensis* (dans l'ordre PDBY, MNM et GYME) en haut, culture liquide de *L. deliciosus* (dans l'ordre milieux PDBY et GYME) en bas 7
Figure 3. Culture liquide de *L. deliciosus* (dans l'ordre : suspension, pièce, broyé) 9
Figure 4. Mesures de la masse sèche des cultures liquides produites 10
Figure 5. Culture in vitro des plants de pin gris et épinette blanche utilisant la méthode de Wong et Fortin 11
Figure 6. Production de masse de mycélium liquide de *Boletus* et *Lactarius* 12
Figure 7. Préparation des inoculums liquides de *L. deliciosus* (ligne du haut) et *B. chippewaensis* (ligne du bas) 13
Figure 8. Traitement des graines avant l'implantation du dispositif 15
Figure 9. Plantation des graines dans un dispositif (gauche), application de la calcite granulaire (droite) 16
Figure 10. Ajout des inoculums des dispositifs expérimentaux 17
Figure 11. Plan du dispositif expérimental 19
Figure 12. Explication du contenu d'une caissette 20
Figure 13. Dispositif de culture des plants mycorhizés à différentes étapes du projet 22
Figure 14. Observation des racines de plants mycorhizés 23
Figure 15. Matériel d'extraction d'ADN (a) et Matériel pour l'amplification de l'ADN (amorces) (b) 24
Figure 16. Suivi de la croissance du mycélium de Boletus sur quatre différents milieux de culture 26
Figure 17. Suivi de la croissance du mycélium de *Boletus* sur milieu Wm avec (expérimental) et sans (témoin) racines de *Cistus* – 1 27
Figure 18. Suivi de la croissance du mycélium de *Boletus* sur milieu Wm avec (expérimental) et sans (témoin) racines de *Cistus* - 2 28
Figure 19. Masse sèche des milieux témoin et avec *Boletus* selon le milieu de culture liquide après 69 jours 29
Figure 20. Masse sèche des milieux témoin et avec *Lactarius* selon le milieu de culture liquide après 75 jours. 29
Figure 21. Masse sèche des milieux témoin et avec *Boletus* selon la méthode d'inoculation après 50 jours. 30
Figure 22. Masse sèche des milieux témoin et avec Lactarius selon la méthode d'inoculation après 54 jours 31
Figure 23. Résultats des semis de résineux inoculés in vitro selon la méthode de Wong et Fortin 32
Figure 24. Vue des racines des plants à la récolte (de gauche à droite : pin gris, pin de Corée, épinette blanche) 34
Figure 25. Exemple de guide de caractéristiques morphologiques de racines spécifiques à certains champignons qui ont été identifiées par le séquençage de l'ADN, mais qui ne comprennent pas les 2 champignons étudiés 35
Figure 26. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez le pin gris 36
Figure 27. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez le pin de Corée 36
Figure 28. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez l'épinette blanche 37
Figure 29. Test de croissance de mycélium prélevé sur les racines des plants inoculés 38

Figure 30. Analyse de lame présentant des colorations de racines de plants inoculés 39
Figure 31. *Suillus brevipes* 40
Figure 32. *Thelephora terrestris* 40
Figure 33. Exemple des résultats de séquençage d'un échantillon dont l'ADN a été amplifié sur Bioédit 41
Figure 34. Résultat de l'électrophorèse des 12 échantillons inoculés avec la souche *L. deliciosus* et du témoin positif qui est encerclé (ADN de *L. deliciosus*) 42

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nombre de propagules viables inoculées par alvéole selon les traitements 17
Tableau 2. Résultats du séquençage des échantillons avec les amorces ITS 1F et ITS 4B 41

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier le ministère de l'Enseignement supérieur, qui a assuré le financement du projet par le biais du programme d'aide à la recherche et au transfert (PART) – volet Innovation technologique.

Le projet a aussi bénéficié d'une aide matérielle importante de l'Université Laval qui a mis à disposition plusieurs de ses laboratoires et une serre pour le bon déroulement du projet. Nous remercions vivement M. Louis Bernier (professeur du Département des sciences du bois et de la forêt) pour cette collaboration très précieuse.

Les différents partenaires du projet se sont montrés toujours très disponibles et ouverts à la discussion tout au long du projet et nous souhaitons les remercier pour leur grande disponibilité et leur intérêt au projet.

RÉSUMÉ

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 (*Boletus*) 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 présente donc un intérêt, autant pour les pépiniéristes que la filière mycologique.

Ce projet a alors pour but de développer et tester plusieurs méthodes pour la production efficace de semis de plants de résineux ectomycorhizés (*Pinus banksiana, Pinus koraiensis* et *Picea glauca*) par des champignons à potentiel commercial (*Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus*), afin de permettre ultimement l'utilisation de cette approche par des pépiniéristes. Plusieurs objectifs spécifiques ont guidé le projet : (1) vérifier quelle(s) technique(s) de production de mycélium liquide (en suspension, broyé ou en emporte-pièce) offre(nt) les meilleurs gains en biomasse de mycélium ; (2) comparer, par la mise en place et le suivi d'un dispositif expérimental en laboratoire, le succès de l'inoculation de graines de 3 essences forestières par deux champignons EC à valeur commerciale ; (3) vérifier quel nombre d'inoculations de mycélium liquide (1, 2 ou 3) offre un taux de colonisation racinaire des essences résineuses par les EC plus élevé et (4) vérifier quelle(s) association(s) d'essences résineuses et de champignon EC offre(nt) les meilleurs gains en biomasse de mycélium et un taux de colonisation racinaire des essences résineuses par les EC plus élevé que les autres.

Ainsi, trois méthodes de production d'inoculum liquide de mycélium ont été testées. Les méthodes par emporte-pièce et par broyage produisent des rendements en mycélium supérieurs à la méthode en suspension dans le cas de *Boletus*. Aucune différence n'a pu être démontrée entre les 3 méthodes pour *Lactarius*.

L'implantation et le suivi pendant 4 mois d'un dispositif expérimental rigoureux, testant 3 modes d'inoculation des 2 champignons sur les 3 essences résineuses visées n'ont malheureusement pas permis d'apporter des réponses satisfaisantes quant aux combinaisons de champignons, essences forestières et méthodes d'inoculation qui apportent le meilleur taux de colonisation racinaire des semis. En effet, le séquençage d'ADN confirme l'absence de *Lactarius* sur les apex racinaires analysés 4 mois après la mise en terre des semences. Dans le cas de *Boletus*, les tests de séquençage n'ont pas été concluants. En revanche, plusieurs champignons mycorhiziens que l'on retrouve couramment dans l'environnement ambiant ont été détectés et ont peut-être été des compétiteurs qui ont nui au développement des 2 champignons ciblés par le projet.

Ainsi, on peut conclure qu'il n'est pas aisé, à la lumière des résultats obtenus, 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.

Plusieurs pistes sont présentées pour poursuivre les recherches sur ce sujet. Il est tout d'abord proposé de vérifier en amont de toute nouvelle démarche, la compatibilité entre les champignons testés et les essences forestières hôtes par un test de Wong et Fortin ou autres techniques de culture *in vitro.* L'augmentation de la concentration de propagules viables ainsi que des essais d'autres modes d'inoculation que la méthode liquide par broyage pourraient être testés. Des inoculations plus tardives au stade des racines secondaires pourraient également influencer le succès de la mychorhization. L'évaluation du taux de survie des propagules dans le sol durant la période de croissance des semis et le suivi du dispositif sur une durée plus longue, qui rendrait alors aussi possible la réalisation d'inoculations plus tardives, permettraient finalement de mieux guider la séquence et la méthode d'inoculation optimales.

1. MISE EN CONTEXTE

Les mycorhizes sont des associations symbiotiques entre un champignon et une plante vasculaire ou une bryophyte. Le fruit de cette association procure des avantages à la fois à la plante vasculaire et au champignon. Pour la plante, les avantages sont multiples, entre autres une meilleure absorption des nutriments et de l'eau, ainsi qu'une meilleure résistance à certains pathogènes. En échange, la plante fournit le carbone et l'énergie nécessaire à la croissance du champignon, sans causer de dommage à son hôte (Fortin, Plenchette et Piché, 2016).

Certains champignons ectomycorhiziens (EC) sont comestibles et à valeur commerciale, par exemple des bolets (*Boletus*), des chanterelles (*Cantharellus*), des lactaires (*Lactarius*) et le matsutake (*Tricholoma matsutake).* Or, la récolte de champignons forestiers à valeur commerciale représente un intérêt grandissant pour les amateurs de produits forestiers non ligneux (PFNL). On assiste présentement à une effervescence de la filière mycologique au Québec. Dans ce contexte, la culture de champignons ectomycorhiziens (EC) comestibles pourrait permettre une diversification des revenus de la forêt québécoise. Plusieurs pépiniéristes rêvent de produire des semis mycorhizés et ainsi permettre d'implanter une culture secondaire au pied de l'arbre mère. La Filière mycologique de la Mauricie a d'ailleurs identifié, parmi les priorités de recherche de son deuxième plan quinquennal, la production de plants mycorhizés par des EC pour le reboisement commercial.

D'autre part, il y a une forte demande, au Québec, pour la production d'arbres à noix. Les pins pignons sont des espèces encore peu cultivées (Gingras, 2009), mais qui produisent dans la nature des symbioses avec des champignons EC (Kikuchi et Futai, 2003). Lee et Kim (1987) ont démontré que le pin de Corée pouvait vivre en association avec la chanterelle commune. La production de semis mycorhizés s'avère donc intéressante pour les producteurs de noix du Québec.

On peut retrouver dans la littérature de nombreux articles ayant testé l'inoculation de graines ou de semis par des champignons EC. Les substrats et les techniques pour inoculer les graines sont variés : sporophores secs broyés, suspension de spores, culture pure de mycélium ou substrats de culture qui peuvent être ajoutés à la graine ou au début de la germination (Khasa, Piché, Coughlan, 2009 ; Repac, 2011). Dans ces études, très peu proposent de produire des semis inoculés par du mycélium liquide à base de champignons qui sont à valeur commerciale. Selon certains représentants de la filière mycologique de la Mauricie, il s'agit de la méthode de production la plus prometteuse et la plus rapide (V. Leblanc et H. Germain, communication personnelle, 24 août 2019). En effet, une fois démarrée, la culture liquide est peu dispendieuse. La même culture liquide peut être utilisée d'année en année, si elle est pure et bien conservée. Comparativement, les cultures par spores et carpophores broyés dépendent de récoltes en forêt et ces types de culture ne sont donc pas une façon durable de produire des inoculums. De plus, il est difficile d'obtenir des cultures pures à partir des spores.

2. OBJECTIFS

Le but du projet est de développer et tester plusieurs méthodes de production efficace de semis de plants de résineux ectomycorhizés par des champignons à potentiel commercial, afin de permettre ultimement l'utilisation de cette approche par des pépiniéristes. Ces méthodes permettront d'allier deux avantages complémentaires : stimuler à la fois la croissance d'essences arborescentes économiquement intéressantes et la production de champignons recherchés par les consommateurs.

Les objectifs spécifiques du projet sont alors :

- Vérifier quelle(s) technique(s) de production de mycélium liquide offre(nt) les meilleurs gains en biomasse de mycélium ;
- Comparer par la mise en place et le suivi d'un dispositif expérimental en laboratoire, le succès de l'inoculation de graines de 3 essences résineuses par deux champignons EC à valeur commerciale, *Boletus chippewaensis*, et *Lactarius deliciosus* ;
- Tester l'inoculation de champignons EC sur deux espèces de pins aux débouchés différents et sur l'épinette blanche :
    - Le pin gris (*Pinus banksiana*) utilisé en reboisement après coupe sur de grandes superficies au Québec ;
    - Un pin pignon (*Pinus koraiensis*), favorisant ainsi la diversification des revenus pour les producteurs de noix du Québec. Comparativement aux autres pins pignons offerts au Québec, *Pinus koraiensis* présente l'avantage d'avoir les cônes les plus gros, de produire plus de noix que les autres et l'expérience a prouvé qu'il pousse très bien dans les conditions québécoises (M. Néri, communication personnelle, le 31 août 2019);
    - L'épinette blanche (*Picea glauca*) utilisée en reboisement après coupe sur de grandes superficies au Québec.
- Vérifier quel nombre d'inoculations de mycélium liquide offre un taux de colonisation racinaire des essences résineuses par les EC plus élevé. À noter que cet objectif remplace l'objectif initialement visé : vérifier quelle(s) technique(s) de production de mycélium liquide offre(nt) un taux de colonisation racinaire des pins par les EC plus élevé ;
- Vérifier quelle(s) association(s) d'essences résineuses et de champignon EC offre(nt) les meilleurs gains en biomasse de mycélium et un taux de colonisation racinaire des essences résineuses par les EC plus élevé que les autres.

3. HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

3.1. METHODES DE PRODUCTION DE MYCELIUM

Hypothèse 1 : La croissance du mycélium augmente selon les méthodes de production de mycélium suivantes :

Suspension < Emporte-pièce < Broyage

3.2. ASSOCIATION CHAMPIGNONS-ESSENCES FORESTIERES

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 inoculation < 2 inoculations < 3 inoculations

Hypothèse 3 : Le taux de colonisation racinaire du mycélium des 2 champignons ectomycorhiziens étudiés chez les semis augmente selon les espèces suivantes :

Pin de Corée < Épinette blanche < Pin gris

4. MÉTHODOLOGIE

Plusieurs étapes ont été réalisées dans le cadre du présent projet. Elles se regroupent en deux grandes sections : le développement des méthodes de production du mycélium et l'analyse de l'interaction champignons-hôte.

Méthodes de production du mycélium

1- Choix des champignons retenus et confirmation par séquençage
2- Cultures solides des 2 champignons
3- Cultures liquides des 2 champignons
    a. 3 méthodes d'inoculation de mycélium
    b. 3 milieux de culture
4- Mesure de la masse sèche issue des cultures liquides
5- Culture in vitro des 2 champignons selon la méthode Ken Wong
6- Production de l'inoculum liquide des 2 champignons et calcul du nombre de propagules viables

Interaction champignons-hôtes

7- Préparation des graines de pins
8- Implantation du dispositif expérimental
9- Culture en serre
10- Analyse des plants et séquençage des EC présents

4.1. CHOIX DES CHAMPIGNONS RETENUS ET CONFIRMATION PAR SEQUENÇAGE

Initialement, trois familles de champignons étaient ciblées lors de la planification du projet, car ces derniers présentaient un potentiel intéressant d'un point de vue de leur valeur commerciale : les bolets (*Boletus),* les chanterelles (*Cantharellus*) et le matsutake (*Tricholoma*). Le matsutake représentait un second choix, car il est reconnu pour se développer sur des racines d'arbres plutôt âgés et ce projet vise le développement de champignons sur des racines de jeunes semis.

La recherche de souches intéressantes a débuté dès l'automne 2019 auprès de plusieurs sources potentielles. Les souches identifiées comme intéressantes ont été testées par séquençage. La technique utilisée est celle de Gagné et al. (2006). L'ADN génomique a été extrait de cultures pures en boite de Petri en utilisant un kit DNeasy (Qiagen, Missisauga, Ontario). Les espaceurs internes transcrits (ITS :*internal transcribed spacer*) des gènes d'ADN ribosomique ont été amplifiés en utilisant les amorces ITS-IF et ITS-4. Le séquençage a été réalisé par la plateforme d'Analyse génomique de l'Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS) de l'Université Laval. Le logiciel BioEdit a permis l'analyse des séquences produites. Les séquences consensus ont ensuite été recherchées dans la base de données publiques GenBank à l'aide de l'algorithme Blast^{n} (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Les recherches réalisées ont été les suivantes :

- Des sporophores de *C. cibarius*, *B. chippewaensis* et *T. magnivelare* ont été récoltés en forêt à l'automne 2019 par Mme Rondeau. Des isolations fongiques ont été réalisées. Un séquençage de leur ADN a confirmé que l'isolation de *B.chippewaensis* a été obtenue et cet échantillon a été retenu dans le projet.
- De nombreuses banques de champignons ont été contactées afin de connaître la disponibilité en souches de *Boletus*, *Cantharellus* et *Tricholoma.*
    - Des souches de *C. cibarius* et de *T. magnivelare* ont été achetées auprès de Pennsylvania State University. Le séquençage de leur ADN n'a pas confirmé leur identité ; les échantillons ont donc été rejetés.
    - Comme aucun échantillon de *Cantharellus* ni de *Tricholoma* n'a pu être finalement trouvé, il a été décidé d'ajouter un autre champignon au projet afin d'en avoir deux : le *Lactarius deliciosus*, qui provient d'un don du Dr. Mousain (INRA Montpellier) à la collection scientifique du Centre d'Étude de la Forêt (CEF). Le séquençage de son ADN a confirmé son identité.

Ainsi, deux souches de champignons ectomycorhiziens font l'objet de la présente étude : ***Boletus chippewaensis* et *Lactarius deliciosus.*** L'ajout du lactaire dans le projet a été fait suite à la recommandation de M. Fortin. Le lactaire présente en effet l'avantage d'avoir une croissance relativement rapide en boite de Petri et était facilement disponible.

4.2. CULTURE SOLIDE DE *BOLETUS CHIPPEWAENSIS* ET *LACTARIUS DELICIOSUS*

Les deux espèces ont tout d'abord été cultivées dans des boites de Petris de milieux PDA. La croissance de *B. chippewaensis* étant très lente en boite de Petri, des tests supplémentaires de culture en milieu solide ont été réalisés afin d'évaluer le meilleur milieu de croissance pour cette espèce.

4.2.1. Culture de *Boletus chippewaensis* dans différents milieux solides

Afin de trouver un milieu de croissance optimal pour l'espèce *B. chippewaensis*, 4 différents substrats ont été sélectionnés :

- **Le milieu GYME** qui est utilisé par le CEF,
- **Le milieu PDAY** (recette provenant de Pennsylvania State University, Mushroom Spawn Lab, 2020) couramment utilisé dans la littérature,
- **Le milieu MNM** modifié (Marx, 1969 ; CEF, 2020), couramment utilisé dans la littérature,
- **Le milieu White (Wm) avec *Cistus incanus.***

Suite aux recommandations de Geneviève Laperriere qui travaillait chez Biopterre qui agit comme conseiller scientifique, il a été décidé d'évaluer la croissance de *B. chippewaensis* en présence de racines de *Cistus* modifiées qui peuvent permettre une symbiose mycorhizienne avec la souche cultivée. La technique utilisée est celle qui a été proposée par Biopterre. Deux fragments de racines de *Cistus* modifiées (provenant du CEF) d'environ 2 cm ont été placés dans le bas d'une boite de Petri de milieu White modifié (Wm) à quelques cm de distance (Figure 1). Après deux semaines de croissance, les racines de *Cistus* furent inoculées avec le mycélium de *Boletus*. Afin de réaliser cette inoculation, des emporte-pièces de 4 mm de

diamètre ont été utilisés pour prélever deux disques de mycélium. Les disques ont été placés à gauche des extrémités racinaires de *Cistus*, à proximité des ramifications racinaires. Deux lignes perpendiculaires qui passent au centre de chacune des pièces ont été tracées afin de prendre des mesures de diamètre de croissance du mycélium.

Pour les 3 autres milieux solides (MNM, PDAY et GYME), des boites de Petri contenant 30 ml des différents milieux de culture solides ont été inoculés avec deux disques de 4 mm de *B. chippewaensis.*

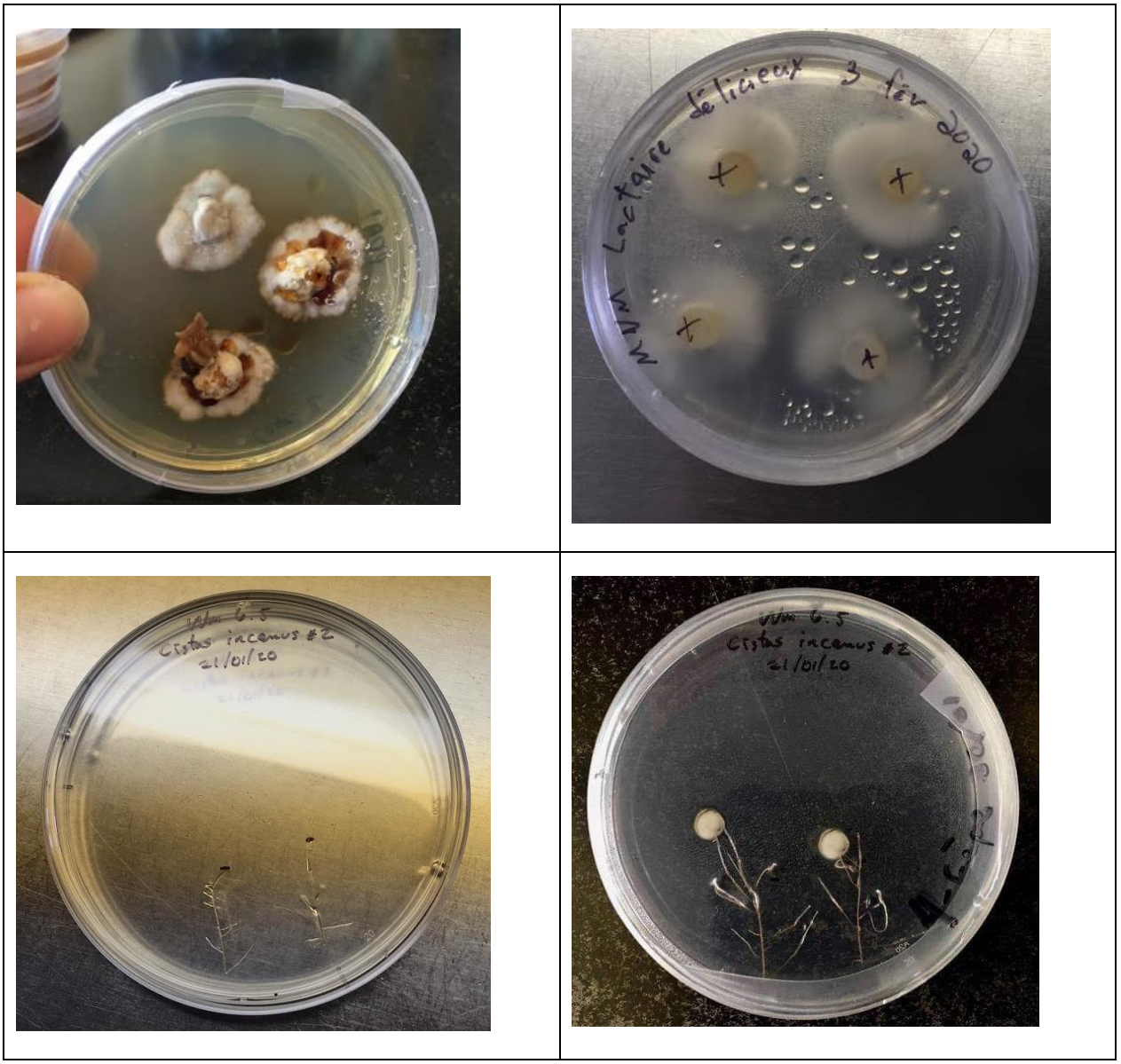


Figure 1. Culture pure de *Boletus chippewaensis* (en haut à gauche) et *Lactarius deliciosus* (en haut à droite), implantation de racines de *Cistus* sur milieu Mw (en bas)

4.3. CULTURES LIQUIDES DE *BOLETUS CHIPPEWAENSIS* ET *LACTARIUS DELICIOSUS*

Les cultures de mycélium solide ont ensuite été utilisées pour produire un inoculum sous forme liquide. Il fallait donc trouver des méthodes efficaces de production de cet inoculum en passant des cultures solides aux cultures liquides. Les méthodes d'inoculation et les milieux utilisés ont été étudiés.

4.3.1. Milieux de culture liquide

Les milieux de culture PDBY, MNM et GYME ont été testés afin de comparer leur efficacité pour la croissance du mycélium de *Boletus* et *Lactarius (*Figure 2*)*. Six disques de mycélium de 4 mm de diamètre ont été placés dans 50 ml de chacun des trois milieux. Les cultures étaient agitées à 110 RPM à 24 ℃. Le temps de croissance des cultures pour ce test était d'une durée de 49 jours (*Boletus*) et 75 jours (*Lactarius*).

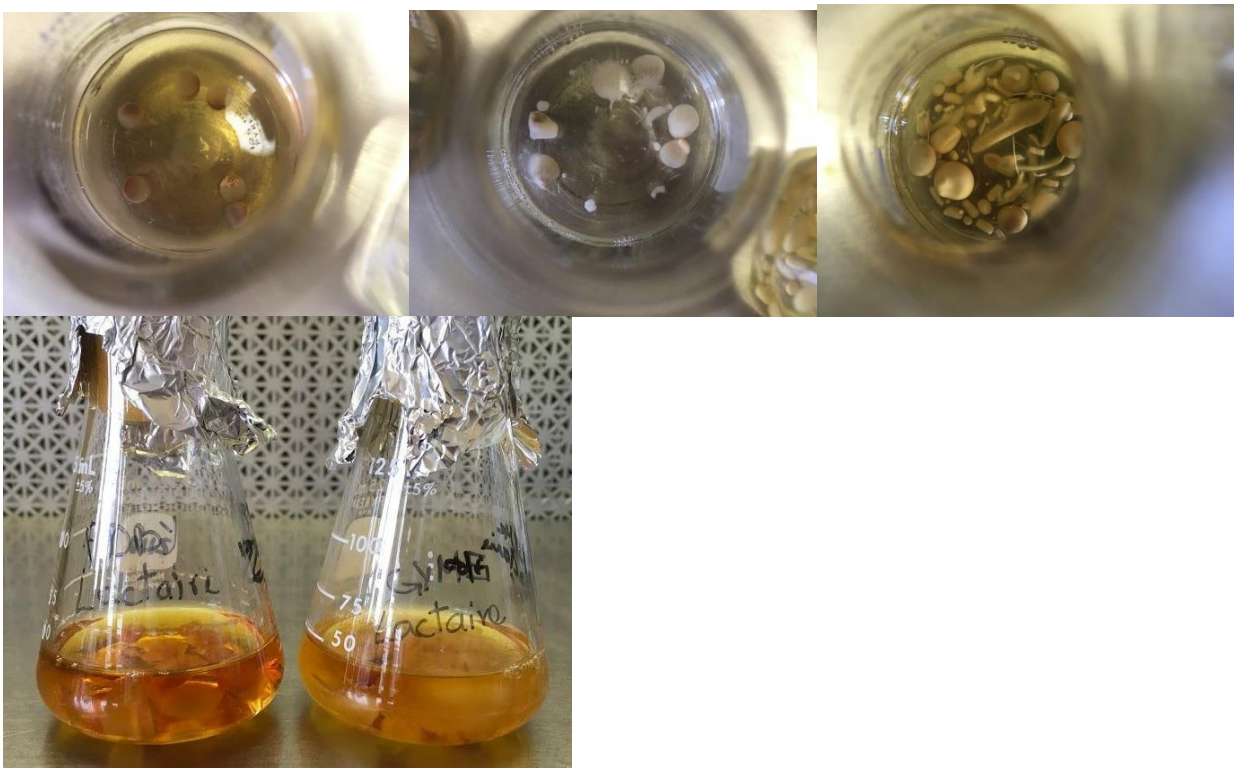


Figure 2. Culture liquide de *Boletus chippewaensis* (dans l'ordre PDBY, MNM et GYME) en haut, culture liquide de *L. deliciosus* (dans l'ordre milieux PDBY et GYME) en bas

4.3.2. Méthodes d'inoculation liquides

Trois techniques d'inoculation de milieu de culture liquide ont été testées (Figure 3) :

- Avec emporte-pièce
- Par broyage
- En suspension

Ces techniques ont été proposées par Vincent Leblanc et Hugo Germain lors de rencontres préalables. Pour ces trois méthodes, des disques de mycélium étaient prélevés sur des géloses (4 disques sur PDAY pour *B. chippewaensis* ou 6 disques sur PDA pour *L. deliciosus*) à l'aide d'un emporte-pièce de 4 mm.

Lors de la technique de l'emporte-pièce (Lee et al., 2007), les pièces étaient directement déposées dans 50 ml du milieu de culture GYME. Pour la technique de broyage (Godbout et Fortin, 1990), les pièces étaient broyées pendant 30 secondes dans un mélangeur (Eberbach) avec 20 ml du milieu de culture. La technique de suspension du mycélium a été effectuée en plaçant 10 ml du milieu de culture dans un bécher dans lequel étaient ajoutées les pièces de mycélium. Les pièces étaient agitées à quelques reprises pendant 30 minutes. Seule la solution de trempage était récupérée. Pour ces trois méthodes, l'inoculum mycélien était déposé dans un erlenmeyer de 125 ml contenant un volume total de 50 ml de milieu de culture GYME liquide. Un total de 21 échantillons (5 échantillons de traitements et 2 de témoins pour chaque méthode) par espèce de champignon ont été produits. Les cultures étaient agitées à 110 RPM à 24 degrés Celsius pendant 50 jours pour *Boletus et* 54 jours pour *Lactarius*.

Figure 3. Culture liquide de *L. deliciosus* (dans l'ordre : suspension, pièce, broyé)

4.4. MESURES DE MASSE SECHE

Afin de connaître le gain de masse des différentes cultures liquides présentées en 2.3.1 et 2.3.2, la technique de la masse sèche a été utilisée. Des filtres Whatman 1 (9 mm) ont été placés au dessiccateur pendant une durée minimale de 48 h puis pesés. L'erlenmeyer contenant la culture liquide a été préalablement agité 10 secondes au vortex. Le contenu de chaque erlenmeyer a ensuite été filtré sous vide et l'erlenmeyer a été rincé à l'eau distillée. Le contenu a ensuite été rincé à l'eau distillée. Les filtres ont été séchés un minimum de 24h à 60°C puis placés pour un minimum de 24h au dessiccateur avant d'être pesés à nouveau (Kim et al., 2010 ; Lee et al., 2007) (Figure 4).

Il faut mentionner qu'une technique utilisant le procédé de lyophilisation a également été testée. Ce processus consistait à centrifuger à 7000 g les cultures liquides dans des tubes de 25 ml, pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant était retiré en conservant environ 10 ml dans les contenants. Les tubes et le mycélium étaient ensuite congelés à -80°C pendant un minimum de 48h. Une lyophilisation de 48h minimum aurait ensuite permis de mesurer la masse sèche de mycélium. Par contre, le mycélium ne séchait pas complètement et restait collé sur les parois des tubes. Cette technique a donc été abandonnée.

Figure 4. Mesures de la masse sèche des cultures liquides produites

4.5. *CULTURE DE BOLETUS* CHIPPEWAENSIS ET *LACTARIUS DELICIOSUS* SELON LA METHODE DE WONG ET FORTIN (1988)

Cette étape du projet n'avait pas été planifiée originalement. Suite aux discussions avec les différents experts consultés (Leblanc, Germain, Bernier, communications personnelles), la question de la compatibilité entre les 2 souches de champignons retenus et les 2 espèces hôtes choisies s'est posée. Le projet débutait en considérant par défaut que les souches d'EC étaient compatibles avec les plantes hôtes du projet soient le pin gris, le pin de Corée et l'épinette blanche. Cette affirmation n'ayant pas été validée, il a été proposé de le tester par un dispositif de culture *in vitro* selon la méthode de Wong et Fortin. Le pin de Corée n'a malheureusement pas pu faire l'objet de ce test, car le nombre de graines disponibles n'était pas suffisant et que le temps de stratification des graines causait un délai trop important dans le calendrier.

Les graines de *Pinus banksiana* et *Picea glauca* ont été désinfectées dans une solution de H_2O_2 30% et agitées pendant 15 minutes, puis elles ont été rincées trois fois dans l'eau distillée stérile pendant 5 minutes. Les graines ont ensuite été cultivées dans des éprouvettes contenant 6 ml de milieu MS salt et placées dans des chambres de croissance. Plusieurs tests de germination (différents temps de désinfection, milieu de croissance et contenants) avaient préalablement été réalisés.

Après 82 jours de croissance, 25 plants ont été déposés sur des boites de Petri contenant du milieu MNM sans sucre selon la méthode Wong et Fortin (1988) adaptée par Azaiez (15 mai 2020, communication personnelle). Trois disques de mycélium ont été implantés au même moment que les plants. Les plants ont été arrosés au besoin avec de l'eau ou du milieu MNM sans sucre (Figure 5). Le suivi de croissance des plants a été difficile, car cela est arrivé en période de confinement dû à la Covid-19. Après 2 mois de croissance, seulement 5 plants étaient toujours vivants et les plants survivants n'étaient pas en très bon état de santé.

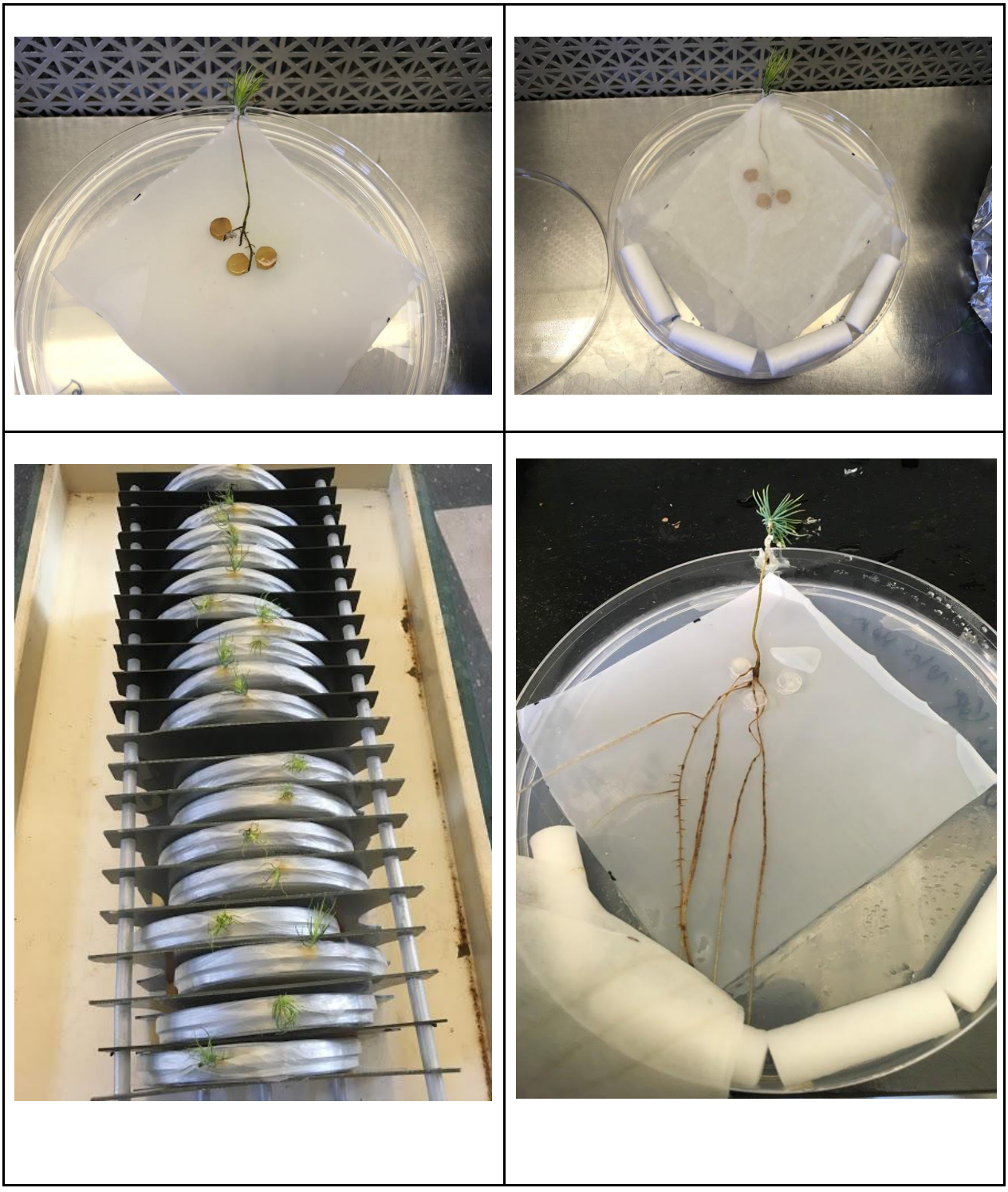


Figure 5. Culture in vitro des plants de pin gris et épinette blanche utilisant la méthode de Wong et Fortin

4.6. PRODUCTION DE L'INOCULUM LIQUIDE DE *BOLETUS CHIPPEWAENSIS* ET *LACTARIUS DELICIOSUS* ET CALCUL DU NOMBRE DE PROPAGULES VIABLES

À partir de différentes cultures liquides réalisées à l'étape 2.3 qui n'ont pas servi à l'étape 2.4 (milieux PDBY et GYME ; mycélium broyé et emporte-pièce), d'une capacité de 50 ml et âgées de 2 mois, les deux espèces de champignon ont été ensuite cultivées séparément dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 200 ml milieu GYME pendant un mois supplémentaire, sous agitation de 110 RPM à 24°C à la noirceur (Figure 6). Le milieu de culture GYME a été privilégié à cette étape, car c'est lui qui a permis de produire les plus grandes quantités de mycélium de *Boletus*, la culture la plus difficile des deux souches à produire (voir section Résultats).

Figure 6. Production de masse de mycélium liquide de *Boletus* et *Lactarius*

A noter qu'il était prévu initialement de produire du mycélium selon plusieurs modes de production différents (broyage, suspension et\ou emporte-pièce) en retenant ceux qui produisaient les plus grandes quantités. Du fait du confinement de mars-avril 2020 qui a rendu l'accès impossible aux laboratoires de l'université Laval, la production de mycélium n'a pu avoir lieu comme prévu. Il a donc été décidé de miser sur une production unique à partir de tous les échantillons de mycélium disponibles.

Les inoculums ont été maintenus en croissance jusqu'à la mi-juin, moment où il a fallu les extraire pour inoculer les graines de pins. Ils ont alors été tamisés en utilisant des pores de 45 micromètres et rincés à plusieurs reprises avec du milieu MNM sans sucre. Les inoculums rincés étaient ensuite fragmentés au malaxeur (Eberbach) 30 secondes avec du milieu MNM sans sucre, puis mis en suspension dans une solution finale de 600 mL de MNM sans sucre (Figure 7). Le nombre de propagules viables par ml dans l'inoculum final pour la première inoculation était de $3{,}09 \times 10^9$ pour le *B. chippewaensis* et de $6{,}39 \times 10^8$ pour le *L. deliciosus* (Gagnon et al., 1987; Guerin-Laguette et al., 2003).

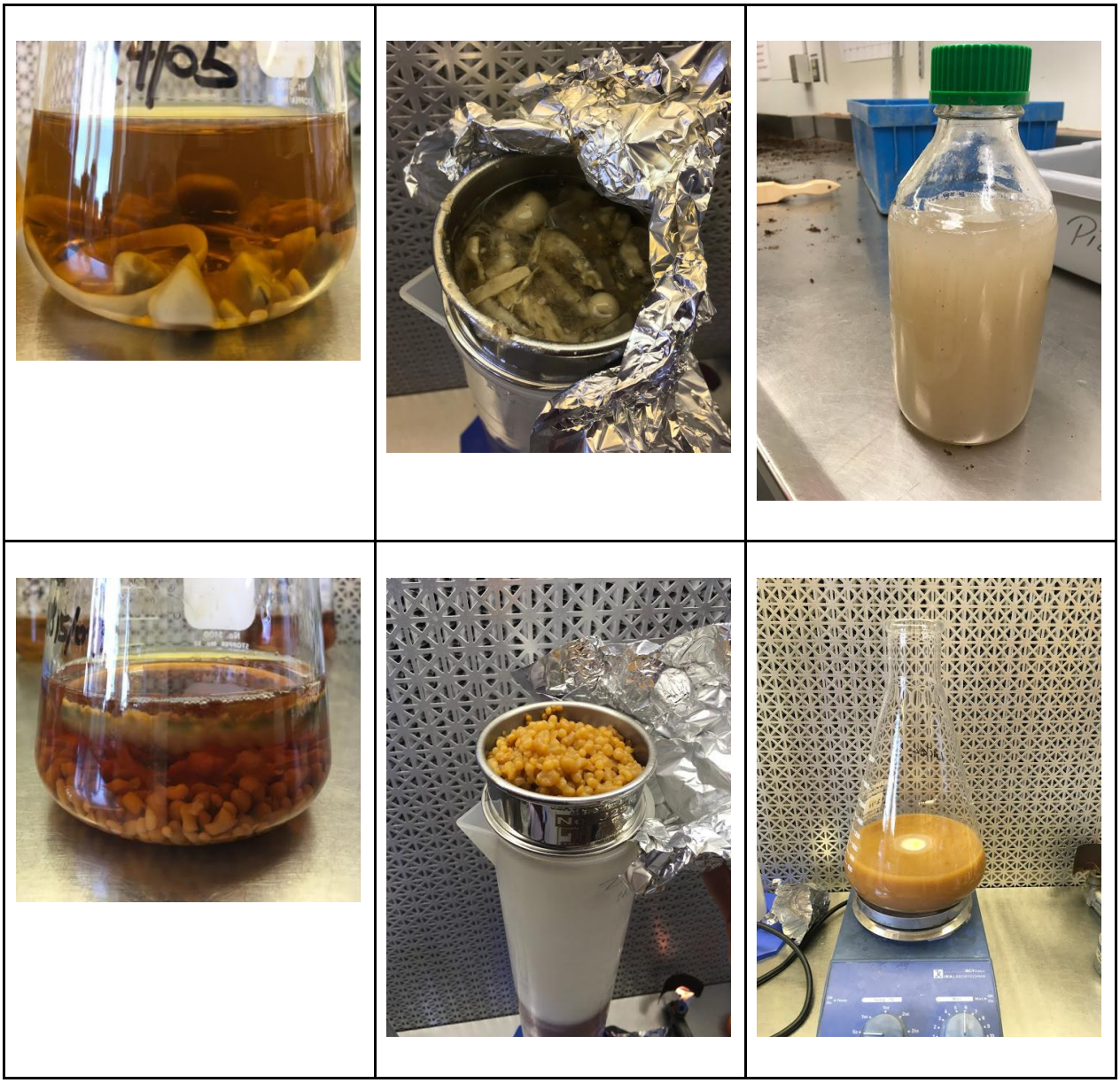


Figure 7. Préparation des inoculums liquides de *L. deliciosus* (ligne du haut) et *B. chippewaensis* (ligne du bas)

Le nombre de propagules viables dans l'inoculum appliqué a été déterminé en effectuant des dilutions sérielles de ces solutions dans un milieu MNM sans sucre à partir de 1 ml de l'inoculum appliqué. Un volume de 1 ml de chacune des dilutions mycéliennes a été déposé sur des géloses PDA et étalé afin de faire le décompte 14 jours plus tard. La masse sèche des inoculums a également été vérifiée.

4.7. PREPARATION DES GRAINES DE PINS ET D'EPINETTES

4.7.1. Graines de *Pinus koraiensis*

Les semences de *Pinus koraiensis* proviennent de la compagnie Arboquebecium. Les graines ont subi un protocole de scarification et de stratification préalablement à leur utilisation (Arboquebecium, 2020; Nature-Action, 2015). Les graines étaient nettoyées à l'eau puis submergées dans l'eau oxygénée pendant 24h. Elles étaient par la suite désinfectées dans une solution d'eau de Javel 2,5% pendant 15 minutes, puis rincées à l'eau courante. Les graines étaient ensuite séchées sur un linge propre en utilisant un ventilateur pendant 24h.

Pour la stratification (débutant le 12 janvier 2020), un mélange de 1 volume de graines pour 3 volumes de mousse de tourbe légèrement humidifiée a été utilisé. Un mélange contenant 28 graines était placé dans chaque sac refermable. Les sacs étaient gardés à température pièce pendant deux mois. Les sacs contenant les semences étaient finalement placés au réfrigérateur entre 1°C et 5°C jusqu'au 18 juin, date de la mise en terre des graines. Durant la stratification, les sacs ont été ouverts et le contenu agité une fois par semaine.

4.7.2. Graines de *Picea glauca* et *Pinus banksiana*

Les semences de *Picea glauca* (lot nº8920082) et *Pinus banksiana* (lot nº842158.0) sont une gracieuseté du Centre national de semences forestières (CNSF). Le taux de germination du lot de pin gris selon le CNSF était de 81% et celui d'épinette blanche de 82,5%. Elles ont été conservées à 4ºC jusqu'à leur utilisation. Ce traitement pendant une semaine minimum est suffisant pour stratifier les graines de pin gris. Dans le cas des graines d'épinette blanche, une stratification au froid est recommandée pendant environ 1 mois. Malheureusement, cette étape a été omise dans le calendrier des manipulations. Pour pallier ce manque et essayer d'accélérer la germination une fois mises en terre, les graines d'épinettes ont été trempées dans l'eau courante pendant 24h le jour précédent leur mise en terre.

4.8. IMPLANTATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

4.8.1. Préparation du substrat et des graines, mise en terre des graines

Un mélange de perlite et vermiculite (80:20) a été disposé dans des récipients de culture de 25 alvéoles de 310 cm^3. La densité a été ajustée à 10g/cm^3. Le substrat a été pasteurisé à 66°C à deux reprises pendant 24h avec un intervalle entre les deux traitements de 48h.

Le traitement de désinfection des graines a été le même pour les trois espèces végétales. Les graines étaient placées dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% pendant 3h à 120 RPM puis rincées 2 fois à l'eau distillée stérile pendant 15 minutes sous agitation. Les graines étaient ensuite séchées sur un filtre stérile et placées 48h au réfrigérateur (Fabienne Colas, communication personnelle). Certaines graines de pin de Corée étaient déjà germées (Figure 8), elles ont donc reçu un traitement différent. Elles ont été désinfectées dans une solution de

Benlate à 100 microgrammes/ml pendant 15 minutes. Elles ont ensuite été rincées deux fois à l'eau distillée stérile puis placées dans une solution stérile d'Agar/eau 0,1% pendant 48h au réfrigérateur.

Désinfection des graines de pin gris

Désinfection des graines de pin de Corée

Graines de pins de Corée ayant germé

Figure 8. Traitement des graines avant l'implantation du dispositif

Dans chaque récipient de culture, 3 graines de pin gris, 4 d'épinette blanche ou 2 de pin de Corée ont été placées sur le substrat selon le dispositif expérimental aléatoire établi. Les graines ont été recouvertes de 24 g de calcite (14 mesh – 1/8) donnée gracieusement par les Calcites duNord (Lamhamedi et al., 2020) (Figure 9).

Figure 9. Plantation des graines dans un dispositif (gauche), application de la calcite granulaire (droite)

4.8.2. Traitements d'inoculation des graines

Trois traitements différents d'inoculation ont été effectués. Il était initialement prévu de tester différents modes de production de mycélium liquide (broyé, en emporte-pièce et en suspension). Comme la production de mycélium a été réalisée en utilisant un mélange de tous les échantillons disponibles (par broyage et par suspension), les traitements proposés varient finalement en fonction du nombre d'inoculations réalisées. Ce nouvel élément du projet a été proposé par le comité de conseillers. Chaque traitement apporte environ la même dose totale d'inoculum (Tableau 1). Pour les traitements recevant une seule inoculation, le substrat a été mélangé directement à l'inoculum. Pour les traitements recevant deux et trois inoculations successives, une première dose d'inoculum a été mélangée au substrat. Les autres doses ont été appliquées en insérant une pipette de 10 ml avec l'extrémité coupée dans la calcite (Figure 10). Ces inoculations ont eu lieu une fois lors de la plantation (18 juin), une 2^{e} fois au stade cotylédons et aiguilles pour la majorité des plants (10 juillet) et dans le cas des unités expérimentales recevant 3 inoculations, 1 mois après la 2^{e} inoculation soit le 10 août.

Trois témoins ont aussi été intégrés au dispositif. Dans leur cas, seul le milieu de culture MNM sans sucre a été mélangé au substrat, sans ajout de champignon :

- Témoin à une inoculation
- Témoin à 2 inoculations
- Témoin à 3 inoculations

Tableau 1. Nombre de propagules viables inoculées par alvéole selon les traitements

Traitement	Nombre total de propagules inoculées	
Nombre d'inoculation	**Cèpes**	**Lactaire**
1	1,31E+09	3,39E+09
2	2,32E+09	3,81E+09
2	1,69E+09	2,64E+09

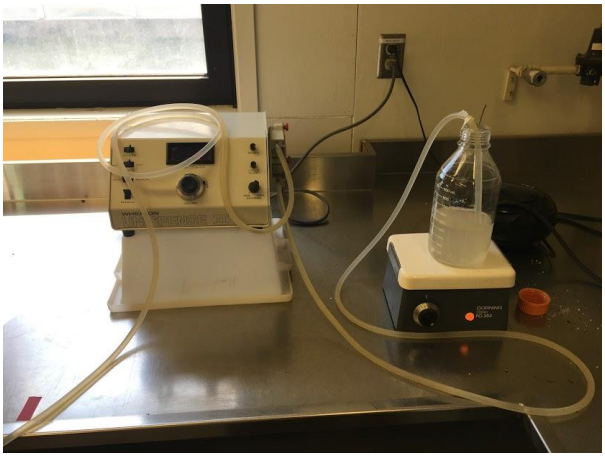


Figure 10. Ajout des inoculums des dispositifs expérimentaux

4.8.3. Plan du dispositif expérimental

Un dispositif expérimental a été implanté le 18 juin 2020. Il est constitué des traitements suivants :

- 1 inoculation au moment de la mise en terre des graines.
- 2 inoculations, une première au moment de la mise en terre des graines et une 2e au stade cotylédons et aiguilles
- 3 inoculations, une première au moment de la mise en terre des graines, une 2e au stade cotylédons et aiguilles et une troisième un mois plus tard

Trois espèces d'arbres sont testées :

- *Pinus Koraiensis*
- *Pinus banksiana*
- *Picea glauca*

Deux souches de champignons sont testées plus un témoin :

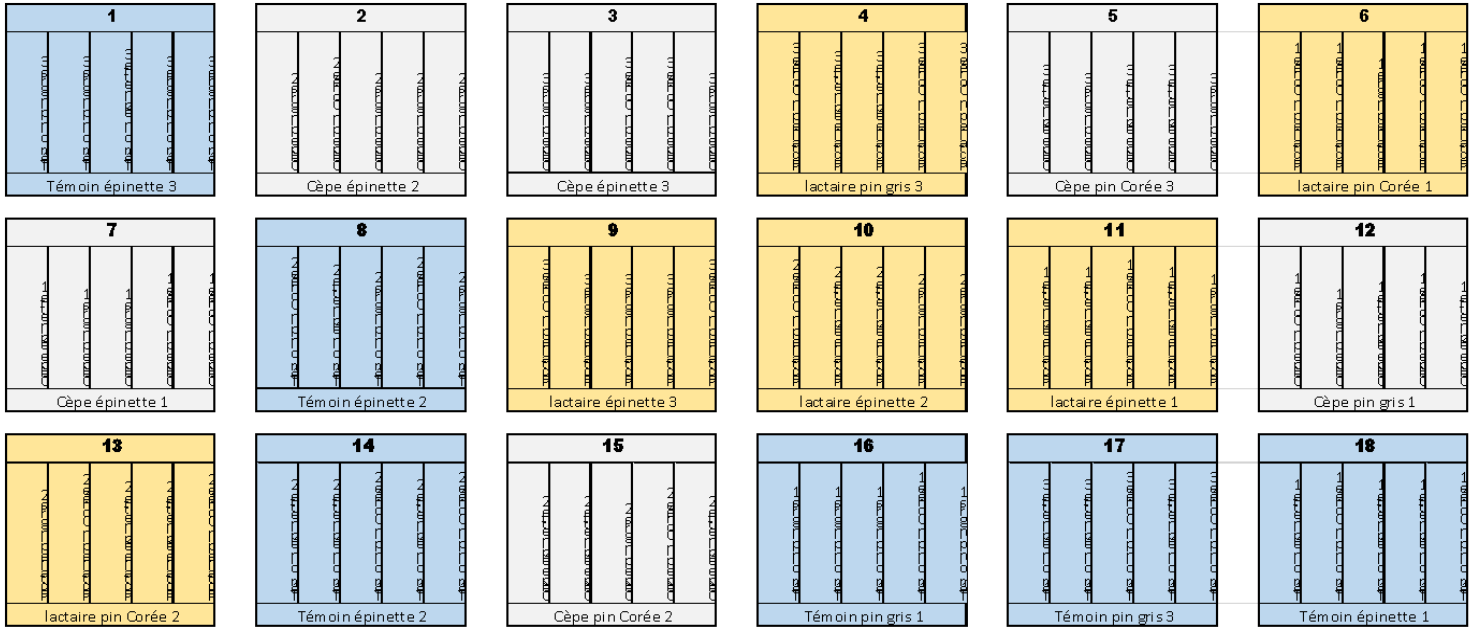
- *Boletus chippewaensis*
- *Lactarius deliciosus*
- Témoin

Le dispositif est composé de 18 caissettes, chacune étant divisée en 6 compartiments. Chaque compartiment comprend 4 alvéoles. Le dispositif expérimental est de type « split-split-plot » :

1. 6 caissettes par type de champignons (Niveau 1 : témoin, lactaires et cèpes) ont été attribuées aléatoirement.
2. Parmi les 6 caissettes de chaque niveau 1 (champignons), les différents traitements d'inoculation (Niveau 2 : 1, 2 ou 3 inoculations) ont été attribués aléatoirement.
3. Pour chaque caissette Niveau1-Niveau2, 2 compartiments ont été attribués aléatoirement à chaque espèce d'arbre (Niveau 3 : Pin de Corée, pin gris et épinette).
4. Dans chaque compartiment, 4 alvéoles ont été ensemencées avec plusieurs graines d'arbres d'une même espèce, afin d'augmenter les chances d'avoir 1 semis par alvéole : 2 graines de pin de Corée, 3 graines de pin gris et 4 graines d'épinette blanche.

Ainsi, quatre répétitions de Traitements X Espèces d'arbres X Champignons ont été planifiées. Dans certains cas, il manque quelques unités expérimentales et seules 3 répétitions sont présentes. Chaque répétition est constituée d'un groupe de 4 alvéoles.

La figure 11 présente le plan du dispositif expérimental. La figure 12 explique le contenu d'une caissette et la figure 13 montre le dispositif dans les serres à plusieurs moments de l'expérience.



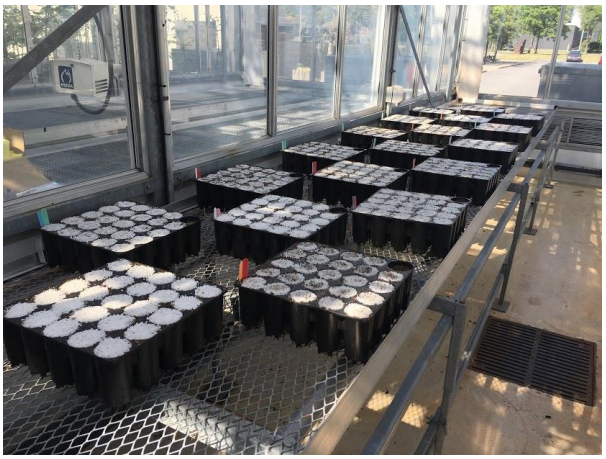
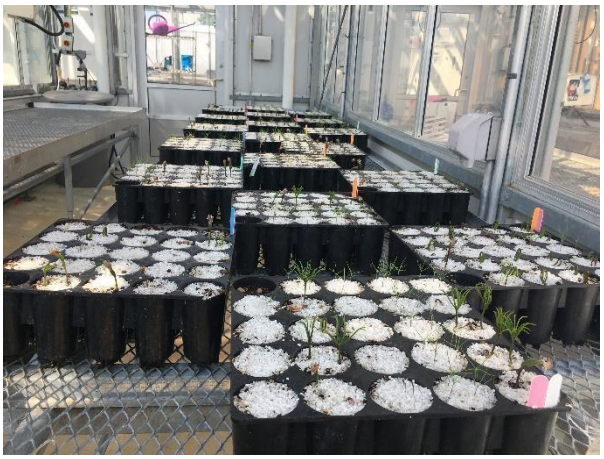
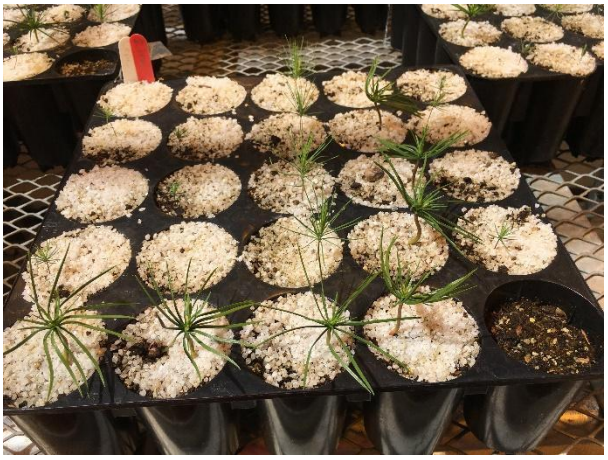
Lactaire pin de Corée 2 : une rangée de 4 alvéoles contenant 2 inoculations de lactaire sur des graines de pin de Corée.

13 Le numéro en haut de chaque groupe correspond au numéro de la caissette.

Figure 11. Plan du dispositif expérimental

11 lactaire épinette 1 | lactaire épinette 1 | lactaire pin Corée 1 | lactaire épinette 1 | lactaire pin gris 1 lactaire épinette 1	 Vue de la caissette 11 le 27 août 2020	La caissette numéro 11 a été inoculée par le lactaire avec 1 seule inoculation. Cette caissette est découpée en 6 compartiments ou unités expérimentales (5 colonnes et 1 ligne à l'avant) dont chacune est constituée de 4 alvéoles. Dans chaque alvéole, on retrouve dans la grande majorité des cas un semis (certaines rares alvéoles ont eu un taux de germination nul).

Figure 12. Explication du contenu d'une caissette

	
Vue le 18 juin 2020	Vue le 2 juillet 2020
	
Vue le 21 juillet 2020 (UE 15)	Vue le 27 août 2020 (UE 10)

Vue le 27 août 2020 (UE 3)	Vue avant la récolte

Figure 13. Dispositif de culture des plants mycorhizés à différentes étapes du projet

4.9. CULTURE EN SERRE

Les plants ont été cultivés un compartiment du Complexe de serres haute-performance sur le site du Pavillon Abitibi-Price de l'Université Laval. Les paramètres de culture sont les suivants : la température de jour est de 23ºC et la nuit 20ºC. La photopériode était de 16h de lumière et 8h d'obscurité. L'humidité relative est la même que celle à l'extérieur. L'intensité de lumière maximale est de 1200 mMol de PAR. Les plants ont reçu un engrais 20-0-20, pour un total en azote entre 42 et 47 mgN/plant. L'arrosage et l'application d'engrais se faisaient par aspersion. L'engrais était appliqué une fois par semaine à partir de l'apparition des vraies feuilles.

Des éclaircies dans les alvéoles ont été réalisées à partir du 10 juillet, afin de ne laisser qu'un plant viable par alvéole. La récolte des plants a eu lieu entre le 13 et le 20 octobre 2020, après 17 semaines de croissance.

4.10. ANALYSE DES PLANTS

L'analyse des plants résineux s'est faite entre le 13 et le 20 octobre 2020. Disposant d'un nombre minimal de 3 répétitions par combinaison de traitements et de 4 alvéoles par unité expérimentale, 162 plants ont été sélectionnés aléatoirement (3 répétitions X 3 champignons X 3 essences végétales X 3 inoculations X 2 alvéoles = 162 plants analysés).

Chaque plant était observé sous la loupe binoculaire (Figure 14). La présence de mycélium autour des racines de la carotte était notée. Lorsque le mycélium était présent, des segments racinaires à proximité des hyphes étaient collectés dans des tubes de microcentrifugation de 1,5 ml contenant différentes solutions. Les apex racinaires pour le séquençage étaient déposés dans du tampon d'extraction (Henrion et al. 1994, modifié par Selosse, 1998 non publié). D'autres segments étaient submergés dans une solution de formol pour être montés sur lames

microscopiques au Cégep Sainte-Foy. Finalement, des apex racinaires ont servi à la mise en culture sur boites de Petri des champignons intra racinaires. Ces derniers étaient placés dans un milieu MNM sans sucre.

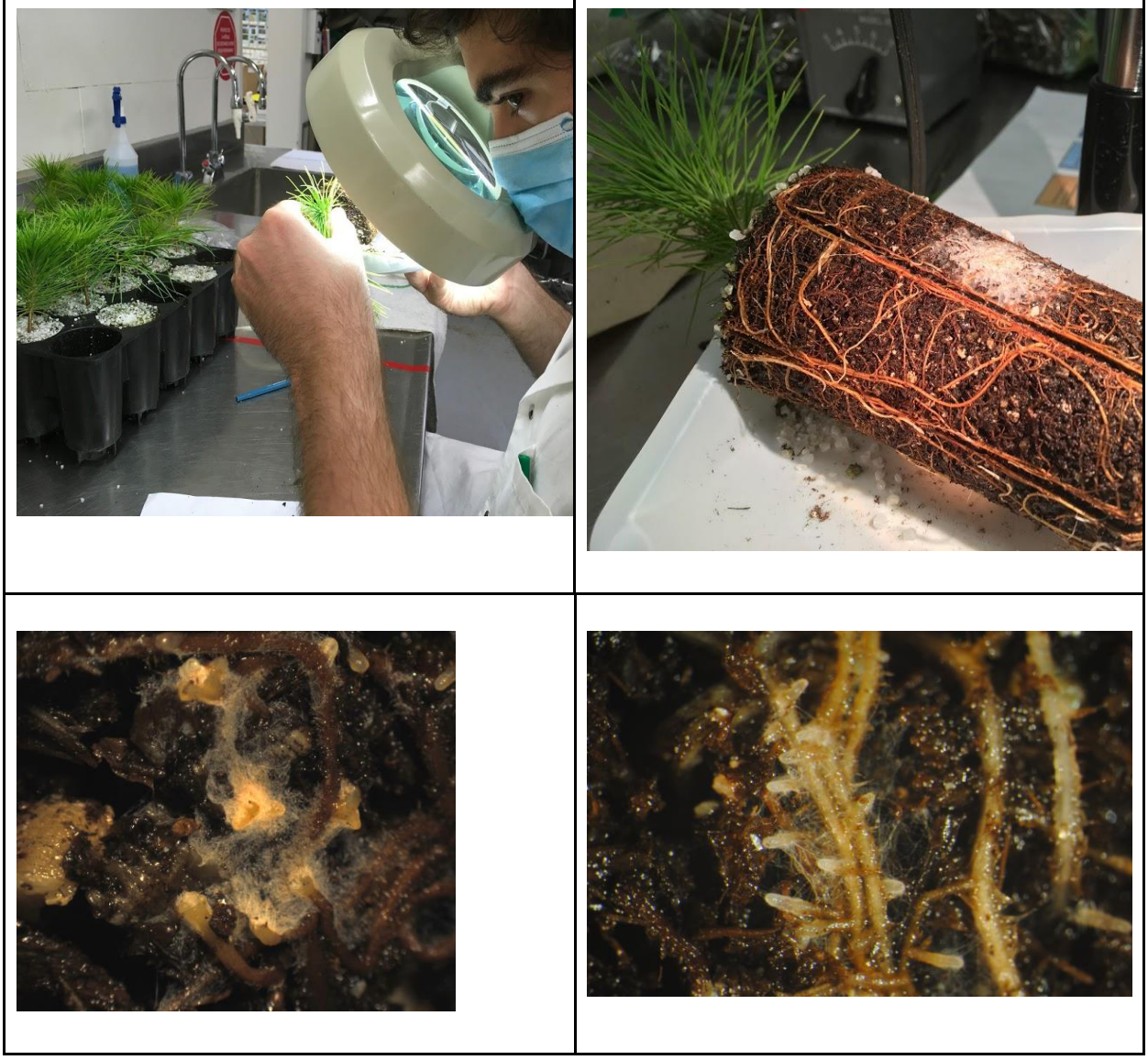


Figure 14. Observation des racines de plants mycorhizés

4.10.1. Séquençage des apex racinaires

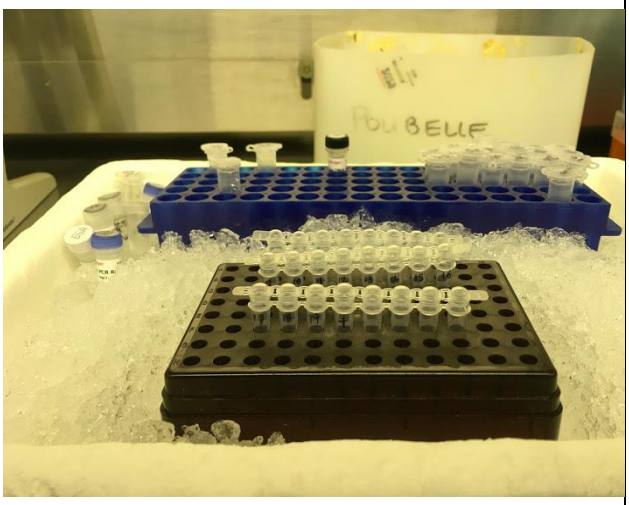
Les techniques de séquençage utilisées sont les mêmes que celles présentées dans la section 2.1. Dans un premier temps, les amorces ITS 1F et ITS 4B furent sélectionnées pour réaliser l'amplification par PCR (Figure 15). Ces amorces permettent d'amplifier la portion ITS des gènes ADNr chez les Eumycètes (ITS1F) du groupe des basidiomycètes (ITS 4B). Les résultats

obtenus ont permis d'amplifier l'ADN ciblé chez les champignons s'étant le plus développés, mais il n'était pas possible de savoir si les espèces recherchées étaient présentes.

La recherche d'amorces plus spécifiques a été envisagée. Les amorces CTK-107 et CTK-108rev ont été utilisées pour le *L. deliciosus* (Kreuzinger et *al.*, 1996) et les amorces BE1 et BE2 pour le *B. chippewaensis* (Lian et *al.*, 2008).

En ce qui concerne *L. deliciosus*, le protocole utilisé était le même que celui de Kreuzinger et *al*. (1996). Pour *B. chippewaensis*, un premier test fut réalisé en suivant le protocole de Lian et *al.* (2008). Un deuxième essai avec les amorces BE1 et B E2 a été réalisé en suivant les procédures de Gagné et *al*. (2006). Des essais différents avec des concentrations de produits à PCR variables et des cycles d'amplifications à 55 et 60℃ ont été réalisés.

a



b

Figure 15. Matériel d'extraction d'ADN (a) et Matériel pour l'amplification de l'ADN (amorces) (b)

4.10.2. Montage des apex racinaires sur lames

Les apex racinaires collectés pour le montage de lames ont été traités par le professeur Daniel Dickner et ses étudiants en Techniques d'analyse biomédicales. Une trentaine d'étudiants ont collaboré dans le cadre de leur cours à raison d'une trentaine de minutes chacun. Les racines étaient installées dans des blocs de parafilm®, puis de fines tranches étaient réalisées au microtome. Les coupes obtenues ont été placées et montées sur des lames pour être observées au microscope optique.

4.10.4. Culture des apex racinaires en boite de Petri

Le milieu MNM dans lequel les apex racinaires étaient conservés a été retiré à l'aide d'une micropipette. Une solution désinfectante de peroxyde d'hydrogène 5% a été ajoutée et les échantillons ont été passés au vortex à 2 reprises pendant un temps d'immersion de 2 minutes. Par la suite, les apex racinaires ont été rincés à deux reprises avec de l'eau distillée stérile. Sous une loupe binoculaire, les apex racinaires ont été sectionnés et déposés (1 ou 2 morceaux) dans une boite de Petri contenant du milieu GYME. Des observations de croissance mycélienne ont été réalisées chaque semaine.

4.11. ANALYSES STATISTIQUES

Les mesures de croissances (surface et masse sèche) sur les différents milieux ont été analysées de façon statistique lorsque possible. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SAS 9.4. Pour toutes les analyses, à moins d'indication contraire, le seuil de significativité a été fixé à 0,05. En général, la procédure « Proc mixed » (https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/stat/141/mixed.pdf) a été utilisée pour comparer les différentes mesures réalisées en considérant comme facteurs fixes les différents traitements, le nombre de jour ou l'interaction entre les deux et comme facteur aléatoire, lorsque possible, l'échantillon (la répétition) ou la boite de Pétri. L'estimation du degré de liberté a été réalisée avec la méthode Kenward-Roger pour petits échantillons (ddfm=KR). Lorsque significatif, un test de comparaison multiple avec LSD en utilisant la macro PDMIX800 (Saxton 1998) a été réalisé.

5. RÉSULTATS

Ce projet comportait plusieurs risques. La durée du projet limitée à une année était depuis le début un enjeu et un facteur limitant. Nous disposions de quelques mois seulement pour les manipulations en laboratoire et d'à peine 4 mois pour la croissance des semis et du mycélium en symbiose avec les racines des semis. La période de confinement au printemps 2020 a réduit la période de manipulation en laboratoire, ce qui a entraîné une production plus restreinte de mycélium et la mortalité de certains échantillons. Dans ce contexte, aucune marge de manœuvre n'était possible pour allonger la période de croissance des semis à une durée supérieure à 4 mois. Dans ce contexte, les résultats du projet sont les suivants.

5.1. CROISSANCE DU MYCELIUM DE *BOLETUS* ET *LACTARIUS* EN MILIEUX SOLIDE ET LIQUIDE

5.1.1. Croissance du mycélium de *Boletus* sur différents milieux solides

Le suivi de la croissance de mycélium de *Boletus* pendant 37 jours sur 4 différents milieux solides est présenté dans la figure 16. Après 37 jours, le milieu MNM permet une croissance mycélienne significativement supérieure à PDAY et *Cistus* + MW ($p<0,05$). Aucune différence significative n'apparaît par contre entre les milieux GYME et MNM, qui sont les deux milieux les plus productifs.

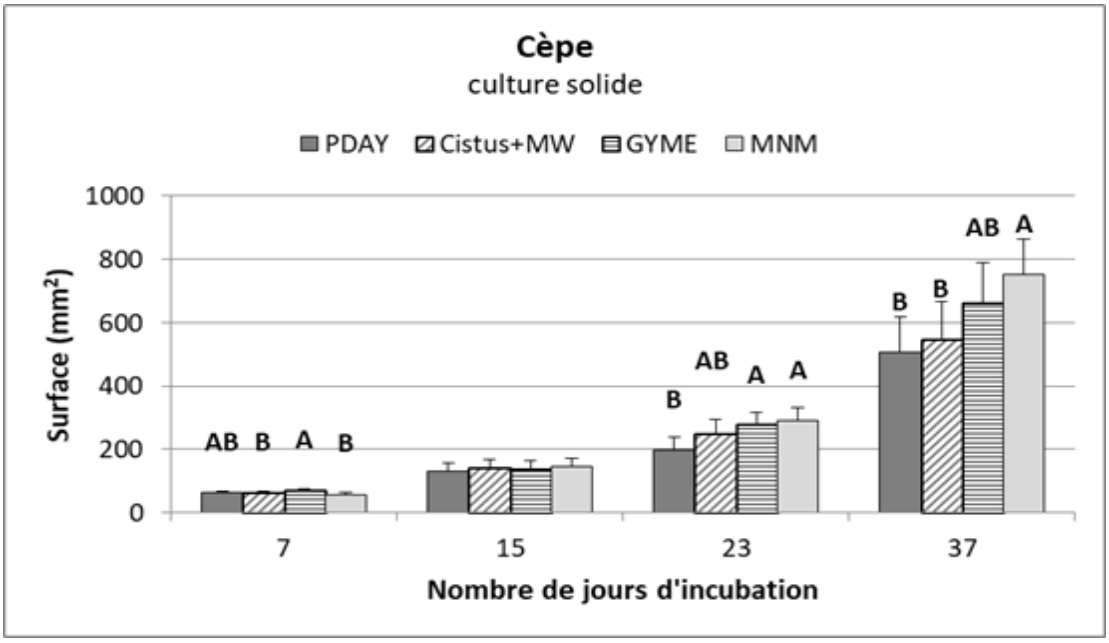


Figure 16. Suivi de la croissance du mycélium de Boletus sur quatre différents milieux de culture

Pour un même jour d'incubation, des lettres distinctes indiquent des différences significatives entre les milieux solides (p <0,05, LSD) issus du modèle de comparaison entre traitements par nombre de jours d'incubation. Chaque barre correspond à 10 échantillons (n=5 répété 2 fois), à l'exception des milieux GYME et *Cistus*+MW à 37 jours qui ont 9 échantillons. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison pour chaque jour d'incubation.

La présence des racines de Cistus contribue également à augmenter la croissance du mycélium sur le milieu Wm (figures 17 et 18). Après 29 et 38 jours, la croissance du mycélium avec Cistus est significativement supérieure à celle sur le milieu Wm témoin (sans Cistus) (p<0,050).

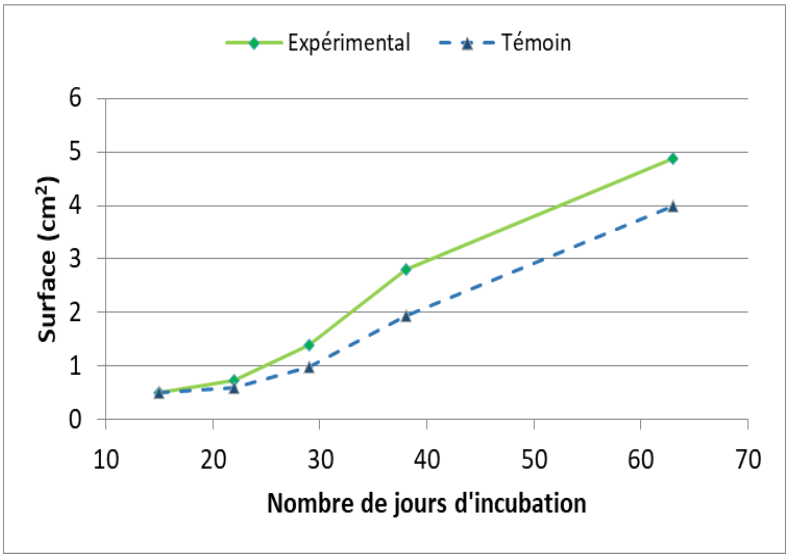


Figure 17. Suivi de la croissance du mycélium de *Boletus* sur milieu Wm avec (expérimental) et sans (témoin) racines de *Cistus* – 1
Expérimental = avec racine de *Cistus*, 12 échantillons ; Témoin = sans racine de *Cistus*, 6 échantillons

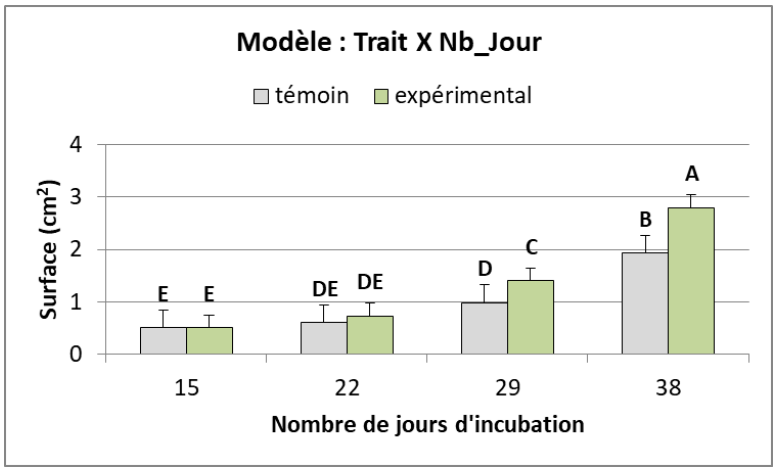


Figure 18. Suivi de la croissance du mycélium de *Boletus* sur milieu Wm avec (expérimental) et sans (témoin) racines de *Cistus* - 2

Les barres représentent les moyennes du modèle d'Anova à effets mixtes (effets fixes : traitement X nombre de jours) ; effets aléatoires : numéro de boite de Pétri). Suivant l'interaction significative (p=0,012), les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et le nombre de jours. Expérimental : 2 répétitions par boite de Pétri (6) (n=12) ; Témoin : 2 répétitions par boite de Pétri (3) (n=6). Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison.

5.1.2. Croissance du mycélium de *Boletus* et *Lactarius* dans différents milieux liquides

Trois milieux de culture liquide (GYME, PDBY et MNM) ont été testés chez les 2 champignons à l'étude. Le témoin correspond au même milieu de culture sans inoculation de champignon. La masse de champignon présent correspond à la différence entre la masse des échantillons avec champignons et celle des échantillons sans champignons.

Dans le cas de *Boletus*, après 69 jours de croissance, le milieu le plus performant est GYME, qui se distingue nettement des 2 autres, où la croissance du champignon est si faible que le poids ne présente aucune différence significative avec les témoins (Figure 19).

Dans le cas de *Lactarius*, après 75 jours de croissance, deux milieux présentent une différence significative par rapport aux témoins (p<0,05) : PDBY qui induit la masse sèche la plus élevée et GYME en deuxième position (Figure 20).

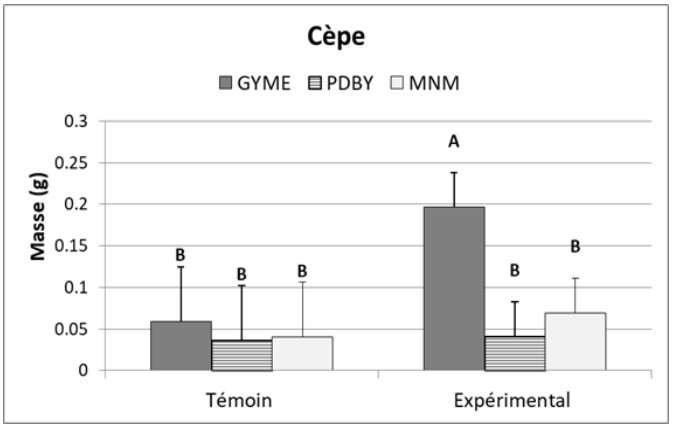


Figure 19. Masse sèche des milieux témoin et avec *Boletus* selon le milieu de culture liquide après 69 jours

Les barres représentent les moyennes du modèle d'Anova : traitement X milieu. Suivant l'interaction significative (p<0,05), les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et milieux. Expérimental : 5 échantillons par milieu ; Témoin : 2 échantillons par milieu. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison.

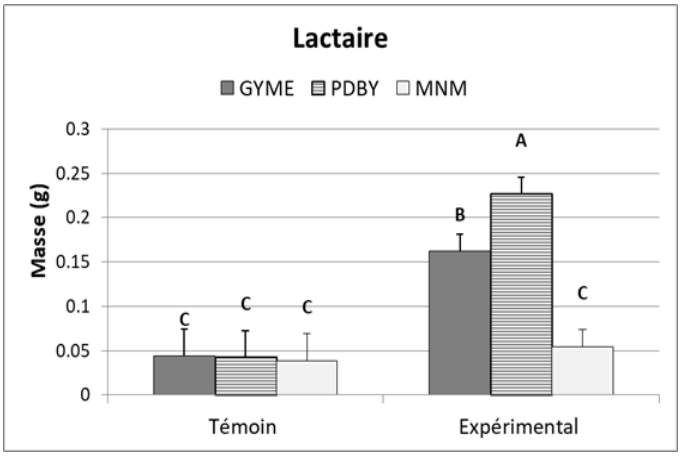


Figure 20. Masse sèche des milieux témoin et avec *Lactarius* selon le milieu de culture liquide après 75 jours.

Les barres représentent les moyennes du modèle d'Anova : traitement x milieu. Suivant l'interaction significative (p<0,05), les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et milieux. Expérimental : 5 échantillons par milieu ; Témoin : 2 échantillons par milieu. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison.

5.1.3. Croissance du mycélium de *Boletus* et *Lactarius* selon les 3 méthodes d'inoculation du mycélium

Les trois méthodes d'inoculation du mycélium (emporte-pièce, broyé et en suspension) ont été testées chez les 2 champignons à l'étude. Le témoin correspond au même milieu de culture

sans inoculation de champignon. La masse de champignon présent correspond à la différence entre la masse des échantillons avec champignons et celle des échantillons sans champignons.

Dans le cas de *Boletus*, après 50 jours de croissance, les deux milieux Broyé et Emporte-pièce permettent d'obtenir une masse sèche significativement supérieure à celle des témoins ($p<0,05$). Le milieu Suspension n'affiche aucune différence avec les témoins (Figure 21).

Dans le cas de *Lactarius*, après 54 jours de croissance, aucune différence significative entre les 3 types d'inoculation n'est remarquable, la seule différence étant une valeur inférieure dans le témoin (Figure 22)

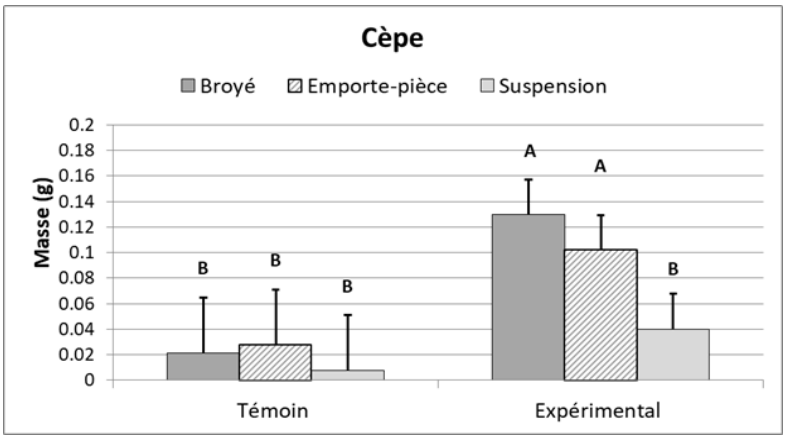


Figure 21. Masse sèche des milieux témoin et avec *Boletus* selon la méthode d'inoculation après 50 jours.

Les barres représentent les moyennes du modèle d'Anova : traitement X méthode d'inoculation. Suivant l'interaction significative ($p<0,05$), les lettres indiquent des différences significatives entre les traitements et méthodes d'inoculation. Expérimental : 5 échantillons par méthode ; Témoin : 2 échantillons par méthode. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison.

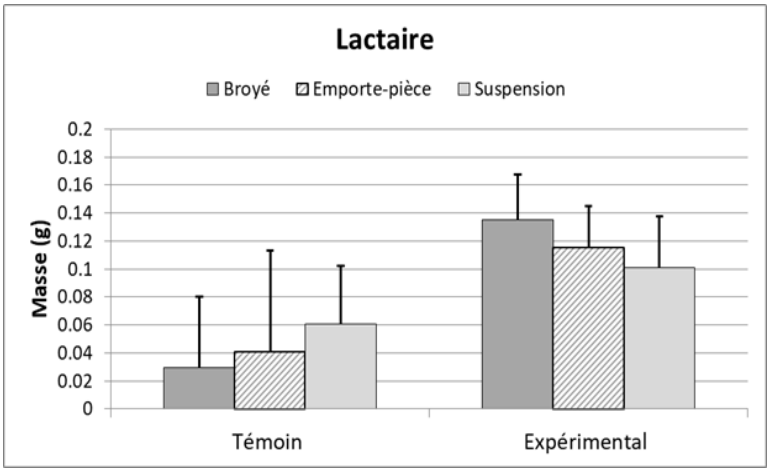


Figure 22. Masse sèche des milieux témoin et avec Lactarius selon la méthode d'inoculation après 54 jours

Les barres représentent les moyennes du modèle d'Anova : traitement X méthode d'inoculation. Aucune interaction significative et aucune différence entre méthode. L'expérimental a une masse significativement supérieure au témoin ($p<0,05$). Expérimental : 5 échantillons par méthode ; Témoin : 2 échantillons par méthode. Les barres d'erreurs correspondent à l'intervalle de confiance (95%) du modèle de comparaison.

5.2. VERIFICATION DE LA COMPATIBILITE EN ASEPSIE ENTRE LES CHAMPIGNONS ET LES ESSENCES FORESTIERES SELON LA METHODE DE WONG ET FORTIN

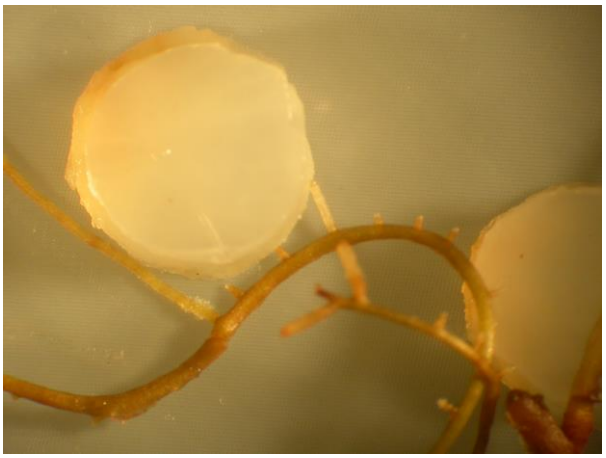
Cette étape du projet a véritablement subi les effets négatifs du confinement imposé au printemps 2020, rendant l'accès aux laboratoires de l'Université Laval impossible. Les plants inoculés dans ces dispositifs ont eu un faible taux de survie. En effet, après 2 mois de croissance, seulement 5 plants étaient toujours vivants et les plants survivants n'étaient pas en très bon état de santé. Les plants survivants étaient :

- 1 pin gris inoculé au bolet
- 1 épinette blanche inoculée au bolet
- 2 pins gris inoculés au lactaire
- 1 témoin pin gris

L'observation à la loupe binoculaire des racines du dispositif Ken Wong n'a pas pu montrer de mycorhization (Figure 23). On pose l'hypothèse que le choix de la coloration des lames utilisée n'a pas permis de bien distinguer le mycélium des cellules corticales. D'autres méthodes de coloration mériteraient d'être testées.

Racines de pin gris inoculées au *B.chippewaensis*

Racines d'épinette inoculées au *B.chippewaensis*



Racines de pin gris inoculées au *Lactarius deliciosus*

Figure 23. Résultats des semis de résineux inoculés in vitro selon la méthode de Wong et Fortin

5.3. ANALYSE DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL

5.3.1. Taux d'occupation des semis dans les alvéoles

Le 29 août 2020, moment où la germination des graines était stabilisée, une évaluation de la présence d'au moins un semis dans chaque alvéole a été réalisée pour les 3 essences forestières. Le taux d'occupation des alvéoles était de :

- Pin gris : 100%
- Pin de Corée : 93 %
- Épinette blanche : 79 %

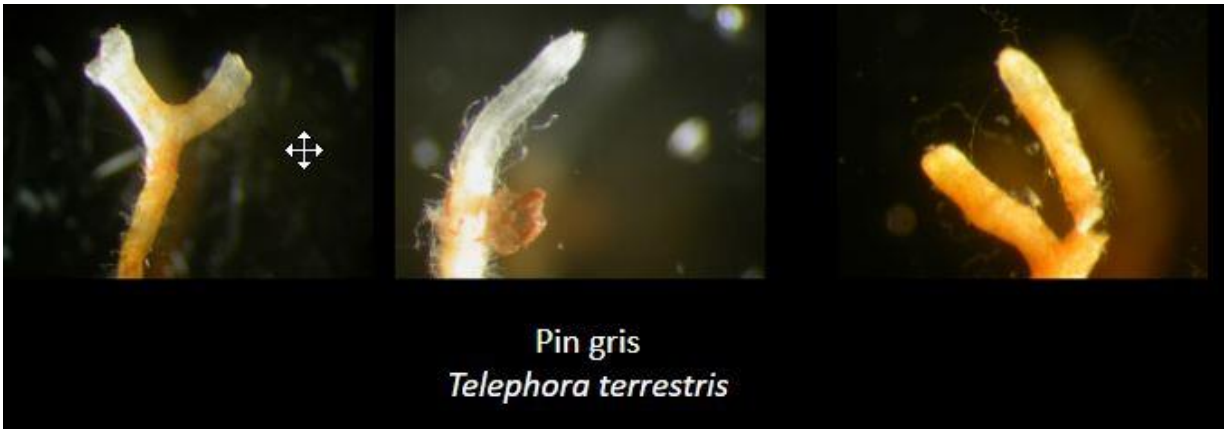
Ces résultats étaient rassurants, car un taux de germination du pin de Corée et de l'épinette blanche plus faible était entrevu.

5.3.2. Pré-test d'évaluation du taux de mycorhization

Le protocole de recherche initial prévoyait de produire un guide des caractéristiques des racines, qui seraient spécifiques de la présence des champignons ectomycorhiziens testés dans le cadre du projet. Ce type de guide a été utilisé par Gagné et *al*. (2006). Par exemple, la littérature mentionne que la présence de racines aux extrémités dichotomiques est souvent signe de présence de mycorhizes.

Plusieurs plants ont donc été récoltés aux fins de monter ce guide de caractéristiques qui seraient spécifiques aux deux champignons ectomycorhiziens du projet (Figure 24). Une première analyse à la loupe binoculaire a permis d'observer différentes morphologies racinaires trouvées chez les différentes espèces forestières. Des photomicrographies ont été collectées (Figure 25). Par la suite, un séquençage de l'ADN des racines a permis de constater que les 2 espèces de champignons étudiées n'étaient pas présentes sur les racines possédant les caractéristiques ciblées. La confirmation de la mycorhization par observation visuelle n'était donc pas possible.

Figure 24. Vue des racines des plants à la récolte (de gauche à droite : pin gris, pin de Corée, épinette blanche)



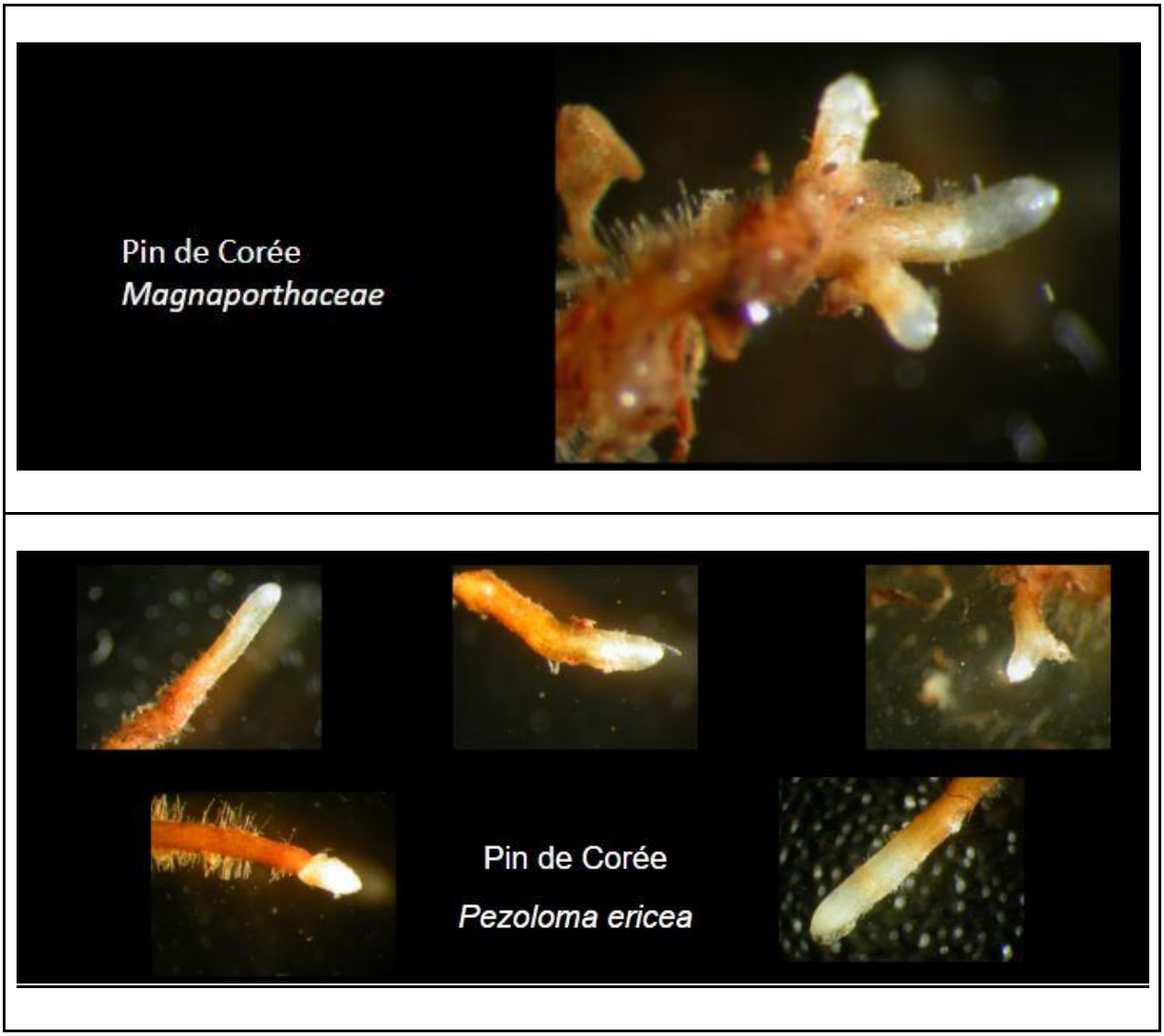


Figure 25. Exemple de guide de caractéristiques morphologiques de racines spécifiques à certains champignons qui ont été identifiées par le séquençage de l'ADN, mais qui ne comprennent pas les 2 champignons étudiés

5.3.3. Présence de mycélium

L'analyse de la présence de mycélium sur les carottes de racines a donné les résultats suivants (Figure 26, Figure 27 et Figure 28) :

- **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 de champignons qui étaient présents dans l'air ambiant de la serre ou dans le substrat utilisé.
- **Pin gris** : la présence de mycélium autour de racines est très importante (en moyenne

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 (moyenne de 4% des plants). La création de relations avec des champignons 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% en moyenne).

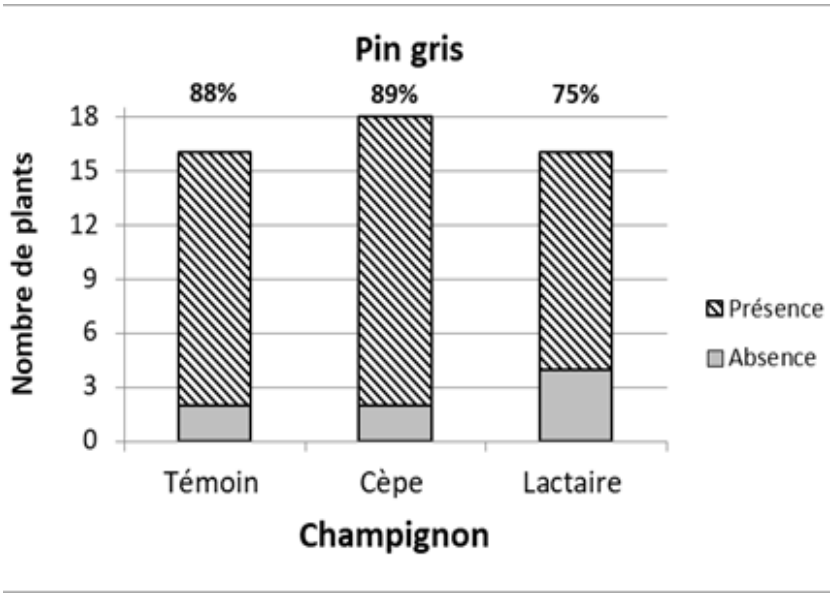


Figure 26. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez le pin gris

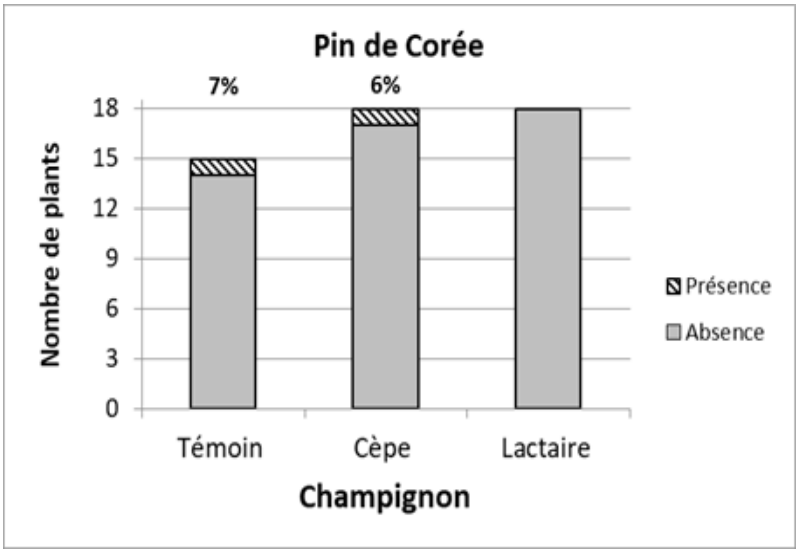


Figure 27. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez le pin de Corée

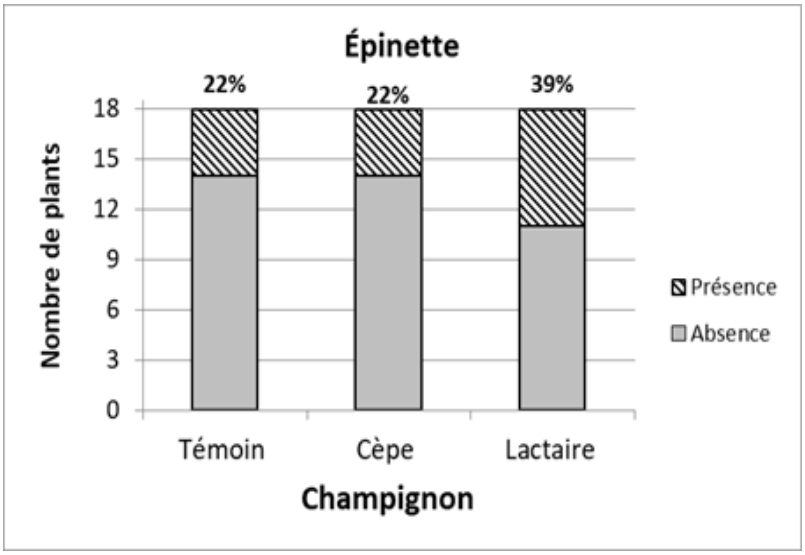


Figure 28. Présence de mycélium sur la carotte de racine chez l'épinette blanche

5.3.4. Croissance du mycélium en boite de Petri

La croissance sur boite de Petri d'échantillons désinfectés de mycélium prélevés sur les racines des plants inoculés n'a pas été concluante : plusieurs espèces variées ont rapidement colonisé les boites de Petri et aucun mycélium caractéristique des 2 champignons recherchés (*Boletus* et *Lactarius*) n'a été observé (Figure 29).

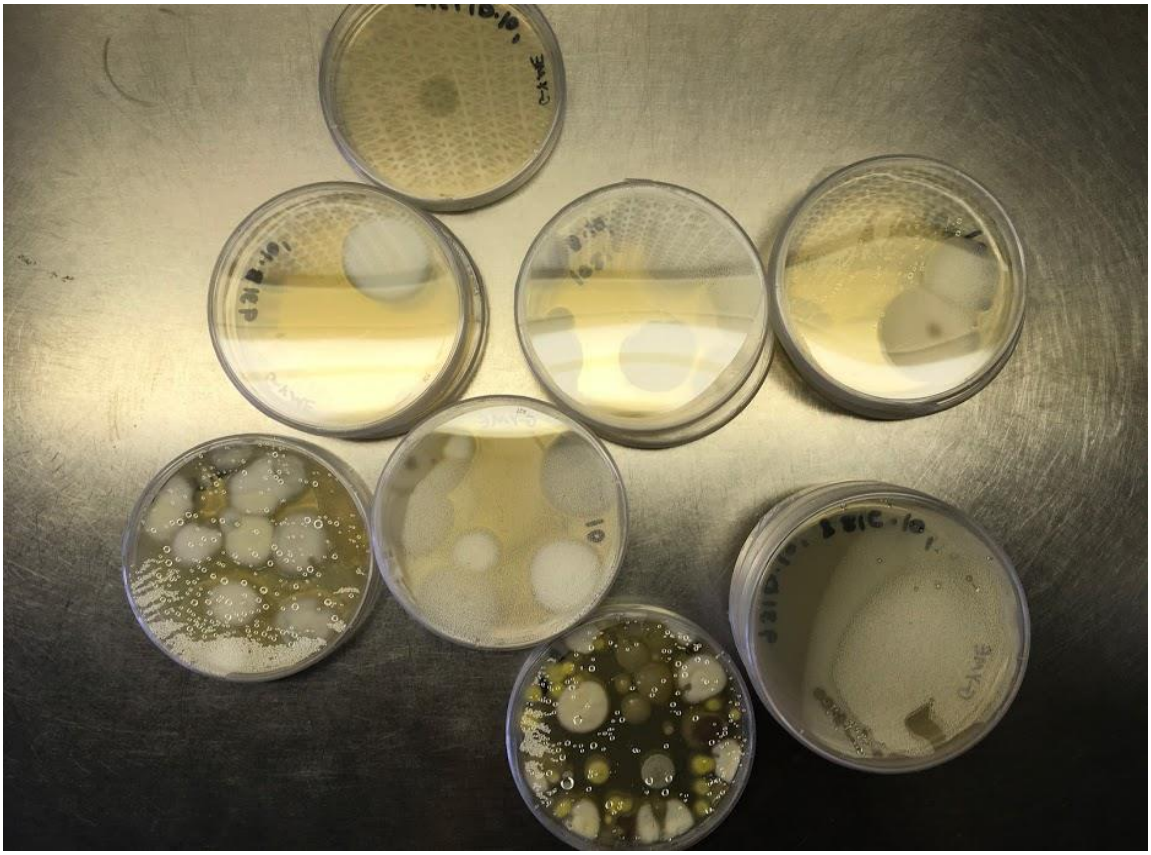


Figure 29. Test de croissance de mycélium prélevé sur les racines des plants inoculés

5.3.5. Coloration des racines

La coloration des racines n'a pas été plus concluante (Figure 30). Il n'a pas été possible de détecter la présence de mycéliums. On pose l'hypothèse que le choix de la coloration utilisée n'a pas permis de bien distinguer le mycélium des cellules corticales.

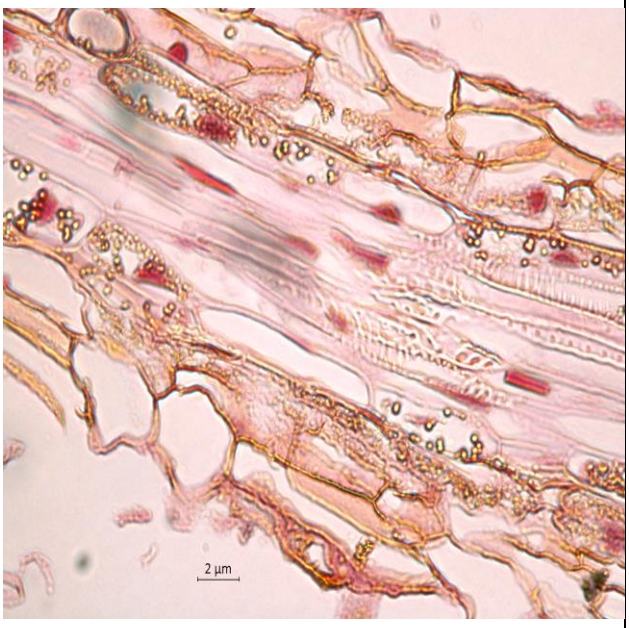


Figure 30. Analyse de lame présentant des colorations de racines de plants inoculés

5.3.6. Séquençage de l'ADN à l'aide des amorces génériques ITS 1F et ITS 4B

Sur les 162 carottes de racines disponibles, 24 échantillons ont été séquencés en utilisant des amorces spécifiques aux champignons (ITS 1F) et aux basidiomycètes (ITS 4B). La figure 33 montre un exemple de résultat de séquençage. Le séquençage de l'ADN des 24 échantillons a donné les résultats suivants (Tableau 2) :

- **Aucun des deux champignons inoculés** n'est identifié dans les séquences amplifiées.
- **Le genre *Suillus* de la famille des basidiomycètes** a été identifié 5 fois, une fois sur le seul échantillon de pin de Corée et dans 4 échantillons de pin gris (Figure 31).
- **Le genre *Thelephora* de la famille des basidiomycètes** a été identifié 10 fois, 6 fois chez le pin gris et 4 fois chez l'épinette blanche (Figure 32). *Thelephora terrestris* est connu pour être un champignon ectomycorhiziens souvent présent dans les serres (Gagné et al., 2006).
- Dans 6 cas, il n'a pas été possible d'identifier le champignon séquencé (non-connu et rien).

Ainsi, le séquençage en utilisant une amorce spécifique aux champignons et une autre aux basidiomycètes a permis de détecter les basidiomycètes s'étant le plus développés dans les échantillons prélevés.

Figure 31. *Suillus brevipes*
Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Suillus_brevipes#/media/File:Suillus_brevipes_98931.jpg

Figure 32. *Thelephora terrestris*
Source : https://www.pinterest.co.uk/pin/240027855119759858/

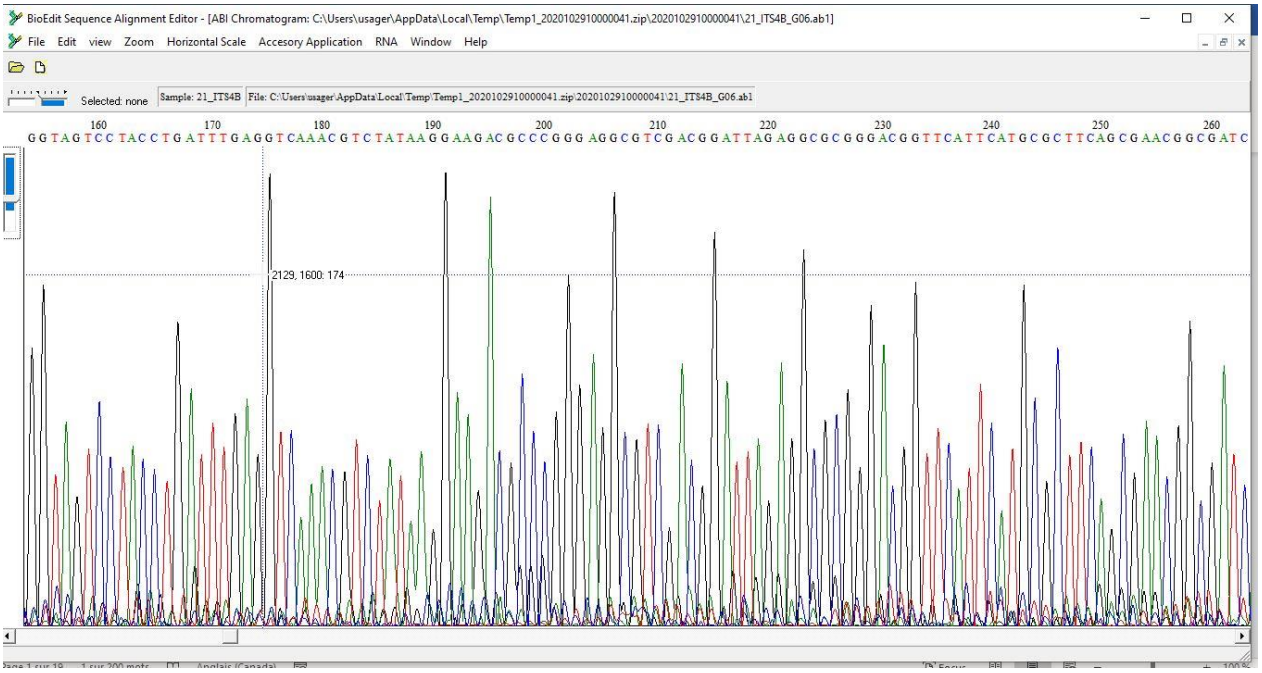


Figure 33. Exemple des résultats de séquençage d'un échantillon dont l'ADN a été amplifié sur Bioédit

Tableau 2. Résultats du séquençage des échantillons à l'aide des amorces ITS 1F et ITS 4B

		Pin de Corée		Épinette		Pin gris		Total	
Genre	Espèce identifiée	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Suillus	Suillus brevipes					2	14%	2	8%
	Suillus flavidus	1	100%					1	4%
	Suillus sp.					2	14%	2	8%
Total Suillus		**1**	**100%**			**4**	**29%**	**5**	**21%**
Thelephora	Thelephora terrestris			2	22%	5	36%	7	29%
	Thelephora sp			1	11%			1	4%
	Uncultured ectomycorrhiza (Thelephoraceae)					1	7%	1	4%
	Uncultured Thelephoraceae clone			1	11%			1	4%
Total Thelephora				**4**	**44%**	**6**	**43%**	**10**	**42%**
non-connu	Uncultured fungus clone					1	7%	1	4%
Rien				5	56%	3	21%	8	33%
Total		**1**	**100%**	**9**	**100%**	**14**	**100%**	**24**	**100%**

5.3.7. L'amplification de l'ADN avec les amorces spécifiques à *Boletus* et *Lactarius*

En ce qui concerne l'utilisation des amorces CTK107 et CTK108rev, les résultats ont montré qu'il y a absence de champignon du genre *Lactarius* dans les 12 échantillons qui avaient été séquencés aux étapes précédentes (Figure 34). La seule marque d'ADN visible à part les 2 échelles aux extrémités est celle du témoin positif de *Lactarius deliciosus* (échantillon dont

l'ADN a déjà été confirmé par séquençage). Comme les autres échantillons n'ont pas montré cette marque, cela veut dire que l'ADN de lactaire est absent des racines isolées et qu'il n'a pu être amplifié (Figure 34).

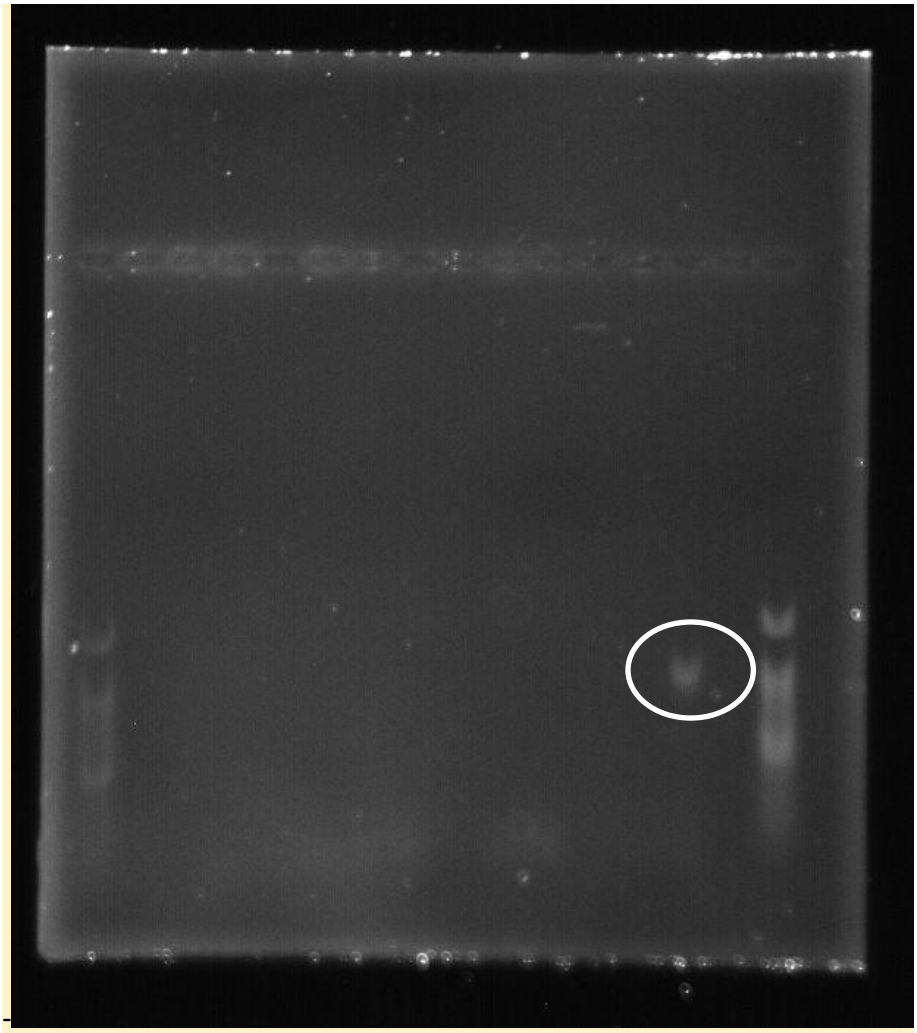


Figure 34. Résultat de l'électrophorèse des 12 échantillons inoculés avec la souche *L. deliciosus* et du témoin positif qui est encerclé (ADN de *L. deliciosus*)

Pour ce qui est des amorces BE1 et BE2 utilisées pour mettre en évidence l'ADN de *Boletus*, les expériences réalisées selon les protocoles de Lian *et al.* (2008) et Gagné et al. (2006) n'ont pas permis de conclure quoi que ce soit. En effet, les échantillons de *Boletus* purs (témoin positif) n'ont pas été révélés par l'électrophorèse, ce qui montre que la méthode est non valide ou des problèmes techniques sont survenus.

5.4. FAITS SAILLANTS

5.4.1. Recherche du milieu de culture liquide permettant la meilleure croissance du mycélium

- ***Boletus*** : l'inoculum produit par broyage ou emporte-pièce procure des résultats similaires, et supérieurs à la production en suspension. Le milieu GYME procure aussi les meilleurs résultats. L'ajout de racine de *Cistus* améliore la croissance du mycélium.
- ***Lactarius*** : aucune différence significative n'est remarquable entre les 3 modes de production d'inoculum. Le milieu PDBY procure les meilleurs résultats, suivi par le milieu GYME.

5.4.2. Réponse des essences forestières à la symbiose avec les champignons ectomychoriziens

- **Pin gris** : les semis ont une présence importante de mycélium et les basidiomycètes ont colonisé 84 % des semis après 4 mois en serre. Le séquençage réalisé ne permet par contre pas de documenter la présence d'autres embranchements de champignons que les basidiomycètes. Deux groupes de champignons basidiomycètes reconnus pour coloniser les serres ont été identifiés spécifiquement : *Suillus* et *Thelephora*.
- **Pin de Coré** : les semis sont peu mycorhizés (4%). *Suillus* a été identifié.
- **Épinette blanche** : les semis ont une présence intermédiaire de mycélium (28%). *Thelephora* a été identifié.
- **Présence de *Boletus* et *Lactarius*** : plusieurs expériences ont été menées pour confirmer la présence des 2 champignons inoculés après 4 mois de croissance en serre. Il a été confirmé que *Lactarius* n'était pas présent sur les échantillons d'apex racinaire analysés chez aucune des 3 essences forestières. 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. Il n'a pas été possible de confirmer la présence/absence de *Boletus*.

6. DISCUSSION

La discussion est orientée vers la réponse aux hypothèses formulées dans la section 1.

6.1. METHODES DE PRODUCTION DE MYCELIUM

<u>Hypothèse 1 :</u> La croissance du mycélium augmente selon les méthodes de production de mycélium suivantes :

Suspension < Emporte-pièce < Broyage

Réponse : Le projet confirme partiellement cette hypothèse pour *Boletus*. Les méthodes par emporte-pièce et broyage présentent des résultats supérieurs à la méthode en suspension. Par contre, aucune différence significative n'existe entre les méthodes par broyage et emporte-pièce.

Suspension < Emporte-pièce = Broyage

Dans le cas de *Lactarius*, cette hypothèse n'est pas confirmée. Les 3 méthodes présentent des résultats variables, et aucune différence significative n'est remarquable.

La méthode en suspension telle qu'elle a été réalisée n'a permis qu'un court contact entre les disques de mycélium et le milieu de culture. Ce contact était vraisemblablement trop limité et n'a pu assurer la présence suffisante de *Boletus* pour qu'il se développe en quantité.

6.2. ASSOCIATION CHAMPIGNONS-ESSENCES FORESTIERES

<u>Hypothèse 2 :</u> Le taux de colonisation racinaire du mycélium des 2 champignons ectomycorhiziens étudiés chez les semis augmente selon les méthodes d'inoculation suivantes :

1 inoculation < 2 inoculations < 3 inoculations

<u>Hypothèse 3 :</u> Le taux de colonisation racinaire du mycélium des 2 champignons ectomycorhiziens étudiés chez les semis augmente selon les espèces suivantes :

Pin de Corée < Épinette blanche < Pin gris

Réponse : Ces 2 hypothèses n'ont pu être validées. Dans le cas de *Lactarius*, on a la confirmation qu'il n'était pas présent sur les apex racinaires au moment de la récolte des semis. En ce qui concerne *Boletus*, les tests de séquençage d'ADN n'ont pas été probants et il n'a pas été possible de confirmer la présence ni l'absence du champignon.

Cependant, d'autres champignons basidiomycètes ont colonisé les apex racinaires des semis des 3 essences forestières. Ces champignons 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 : Pin de Corée < Épinette blanche < Pin gris

Plusieurs pistes pourraient expliquer l'absence de mycélium des 2 champignons à l'étude sur les racines des semis, sachant qu'ils ont été inoculés avec des propagules qui étaient viables au moment de l'inoculation :

- **Absence de démonstration de la compatibilité entre les champignons et les essences forestières choisis** : Le choix de l'isolat des espèces fongiques est très important. Il aurait été nécessaire de travailler avec des souches fongiques qui sont spécifiques aux hôtes utilisés. Une association essence-hôte précise est suggérée par Poitou *et al.* (1983) pour assurer la réussite d'une symbiose EC. Yun *et al.* (2002) ont fait des tests de compatibilité en laboratoire entre les souches fongiques et les espèces végétales hôtes visées, afin de déterminer les meilleures souches. La compatibilité entre le pin gris et *Boletus chippewaensis* a été démontrée par Guerin-Laguette et al. (2020). La symbiose de *Lactarius deliciosus* avec plusieurs pins est aussi confirmée par ces mêmes auteurs, mais pas spécifiquement pour les pins gris et de Corée. Dans ce projet, des tests de compatibilité selon la méthode de Wong et Fortin ont été amorcés, spécifiquement entre les 2 champignons étudiés et les 3 espèces d'arbres. Cependant, ils n'ont pu aboutir à cause du confinement qui a entraîné la mort des échantillons. Plusieurs études ont été effectuées à l'Université Laval afin de démontrer l'importance de sélectionner des souches fongiques issues de croisements spécifiques assurant ainsi une compatibilité des champignons ectomycorhiziens avec leur hôte (Rosado et al, 1994 ; Wong et Fortin, 1990 ; Lamhammedi et al., 1990).

- **Inoculum trop dilué** : il est possible que l'inoculum ait été trop dilué pour permettre le développement d'un mycélium viable. La quantité d'inoculum total produit a été limitée par le confinement. Tout l'inoculum a été utilisé, et a été divisé selon le nombre de plants à inoculer. La concentration de propagules inoculées par plant forestier s'est alors avérée très faible (entre 1,3 E+09 et 3,8 E+09 par traitement). En effet, Nnenna *et al.* (2014) ont utilisé un inoculum de 5 $X10^3$ propagules/mL en appliquant 15 ml au total de cet inoculum. Parladé *et al.* (2003) concluent également en soulignant l'importance de faire des études sur les doses d'inoculum pour expliquer le taux de colonisation faible de leurs plants inoculés en serre par une solution liquide fragmentée.

- **Méthode de production du mycélium** : la culture de mycélium à partir d'inoculum liquide est le mode d'inoculation le plus fréquent et c'est une des raisons qui expliquent ce choix dans le présent projet. Cependant, l'utilisation d'un 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 avec emporte-pièce ou d'inoculum solide aurait peut-être augmenté la longévité des propagules. En effet, Parladé *et al.* (2003) ont ajouté un inoculum solide de *L. deliciosus* à des semis de pin transplantés en serre et ils ont obtenu des résultats supérieurs à l'application d'un inoculum liquide. Plusieurs inconvénients de ce type d'inoculum sont tout de même présentés par les auteurs : l'inoculum a une croissance très lente dans un substrat solide, la culture est facilement contaminée et la

sécheresse est difficile à contrôler.

- **Milieu de croissance non stérile** : il a été choisi volontairement de ne pas utiliser un substrat de croissance stérile car le but de ce projet était de développer une méthode de croissance de semis compatible avec les techniques utilisées par les pépiniéristes. Dans ce contexte, la pasteurisation du substrat a été retenue plutôt que la stérilisation à l'autoclave. L'absence de milieu stérile a par contre ouvert la possibilité de voir se développer d'autres champignons non souhaités.

- **Croissance très lente des 2 champignons étudiés *versus* la durée de croissance des semis** : le dispositif expérimental s'est déroulé sur à peine 4 mois (correspondant aux limites temporelles allouées au projet). En présence de champignons à croissance lente, il est possible que cette période n'ait pas été assez suffisante pour permettre le développement des 2 champignons et que ces derniers soient morts avant d'avoir mycorhizé les semis. Ainsi, selon Strullu *et al.* (1986), il est suggéré d'attendre que les racines secondaires soient présentes avant l'introduction de l'inoculum.
  Également, il est mentionné que la compatibilité entre les conditions d'enracinement et l'activité fongique est un facteur important de réussite. Yun *et al.* (2002) ont, quant à eux, observé les premières mycorhizations de *Lactarius deliciosus* sur des semis de pin âgés de 6 mois.

- **Croissance très lente des 2 champignons étudiés *versus* la compétition avec d'autres champignons plus compétitifs** : Les 2 champignons étudiés sont reconnus pour avoir une croissance lente comparativement à d'autres champignons plus opportunistes qui se trouvent naturellement dans l'environnement ambiant. Il est donc possible que leur croissance ait été tellement lente qu'ils n'ont pas réussi à compétitionner avec les autres champignons naturellement présents, ce qui aurait entraîné leur mort. Plusieurs études confirment cette tendance. Olivier *et al.* (1996) mentionnent le taux de perte élevé dans leurs expériences par des compétiteurs exogènes. Ils ont remarqué entre autres que les *Suillus sp*. sont très compétitifs en présence de résineux. Yun *et al.* (2002) émettent l'hypothèse que le succès de la prolifération des racines mycorhizées par le Lactaire délicieux dans leur expérience est peut-être causé par l'absence de compétiteurs dans le milieu. Parladé *et al.* (2003) ont remarqué un taux de colonisation très élevé de leur semis de pin lorsqu'ils sont produits de façon stérile et un déclin de cette colonisation lorsqu'ils sont transplantés en serre dans un milieu non aseptique.

7. RECOMMANDATIONS

Aux vues des résultats du projet, les recommandations suivantes sont proposées :

1- **Tester d'autres milieux de production des propagules**. La production de propagules a été d'un rythme lent. Plusieurs pistes de solution sont proposées pour tenter d'accélérer et donc d'augmenter la production : ajouter du CO_2 dans le milieu de culture, modifier le type d'agitateur utilisé (utiliser le barreau magnétique à la place de l'agitateur orbital).

2- **Confirmer la compatibilité entre les champignons et les essences forestières :** des tests de Wong et Fortin ont été mis en place afin de tester la compatibilité entre les champignons et les essences forestières. Malheureusement, le confinement du printemps 2020 et l'absence possible de suivi des échantillons a entraîné la mort de presque tous les échantillons, ne permettant pas de conclure sur la compatibilité. Comme ces tests sont laborieux à développer et demandent un certain temps d'implantation, il n'a pas été possible de les reproduire dans le contexte du présent projet. Devant l'importance de valider la compatibilité entre les champignons EC et les essences forestières qui sont inoculées, il serait donc vraiment très judicieux de reprendre ce type de test, avant de se lancer dans de nouvelles expérimentations entre les 2 champignons étudiés et les 3 essences forestières. L'absence de présence d'ADN de *Lactarius* sur les échantillons testés d'apex racinaires de pin gris, de pin de Corée et d'épinette blanche après 4 mois de croissance pose en effet certains doutes sur la compatibilité possible entre les espèces étudiées.

3- **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. La pasteurisation à moins de 63℃ permet aussi de ne pas tuer des bactéries bénéfiques au développement des EC. Mais l'absence de milieu stérile a par contre ouvert la porte à des champignons compétiteurs.

4- **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.

5- **Tester le mycélium liquide en emporte-pièce ou le mycélium solide et ainsi augmenter la densité des propagules inoculées :** le mode d'inoculation testé peut être la cause de l'échec de la production de mycélium. Il serait donc pertinent de tester d'autres modes d'Inoculation qui procureraient une concentration plus élevée de propagules et permettraient aussi peut-être d'augmenter leur durée de vie. En saturant davantage le milieu en propagules, cela augmenterait les chances de colonisation des champignons étudiés, entre autres dans un contexte de compétition avec des champignons présents naturellement.

6- **Introduire l'inoculum lorsque les plants sont plus développés :** des inoculations au stade de racines secondaires sont suggérées par certains auteurs.

7- **Vérifier le taux de survie des propagules dans le sol :** dans le cadre du présent

projet, on a la certitude que des propagules viables ont été inoculées le jour de l'implantation du dispositif et à une ou deux autres reprises dans le cas des 2 et 3 inoculations. On a aussi la confirmation que *Lactarius* n'était plus vivant autour des racines de plants analysées après 4 mois de croissance racinaire. Entre les inoculations et la récolte des semis, aucune donnée de survie des propagules n'a été prise. Une telle donnée permettrait de comprendre à quel moment les propagules sont mortes et permettrait d'ajuster les traitements d'inoculations.

8- **Allonger la durée de suivi du dispositif :** le présent projet était limité à une durée d'un an, faisant en sorte que le dispositif expérimental en serre n'a pu être suivi que pendant 4 mois. Comme les champignons étudiés sont à croissance lente, il serait pertinent de suivre sur une période plus longue un tel dispositif, en particulier si on a la preuve que des propagules viables sont présentes. En ayant une culture qui s'échelonne sur une période plus longue, il aurait également été possible d'inoculer des plants plus âgés.

8. CONCLUSION

Ce projet avait pour but de développer et tester plusieurs méthodes de 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*), afin de permettre ultimement l'utilisation de cette approche par des pépiniéristes.

Trois méthodes de production d'inoculum liquide de mycélium ont été testées. Les méthodes par emporte-pièce et par broyage produisent des rendements en mycélium supérieurs à la méthode en suspension dans le cas de *Boletus*. Aucune différence n'a pu être démontrée entre les 3 méthodes pour *Lactarius*.

L'implantation et le suivi pendant 4 mois d'un dispositif expérimental rigoureux, testant 3 modes d'inoculation des 2 champignons sur les 3 essences résineuses visées n'ont malheureusement pas permis d'apporter des réponses satisfaisantes quant aux combinaisons de champignons, essences forestières et méthodes d'inoculation qui apportent le meilleur taux de colonisation racinaire des semis. En effet, le séquençage d'ADN confirme l'absence de *Lactarius* sur les apex racinaires analysés 4 mois après la mise en terre des semences. Dans le cas de *Boletus*, les tests de séquençage n'ont pas été concluants. En revanche, plusieurs champignons mycorhiziens que l'on retrouve couramment dans l'environnement ambiant ont été détectés et ont peut-être été des compétiteurs qui ont nui au développement des 2 champignons ciblés par le projet.

Ce projet apporte pour finir quelques pistes de recommandations, en vue de poursuivre les recherches sur ce sujet. Il est ainsi proposé de vérifier en amont la compatibilité entre les champignons testés et les essences forestières hôtes par un test de Wong et Fortin ou autres techniques de culture *in vitro*, d'augmenter lors des inoculations la concentration de propagules viables et de tester d'autres modes d'inoculation que la méthode par broyage. Des inoculations réalisées plus tardivement, au stade des racines secondaires, pourraient aussi influencer le succès de la mycorhization. L'évaluation du taux de survie des propagules dans le sol durant la période de croissance des semis et le suivi du dispositif sur une durée plus longue, qui rendrait alors aussi possible la réalisation d'inoculations plus tardives permettraient également de mieux guider la séquence et la méthode d'inoculation optimales.

Ainsi, on peut conclure qu'il n'est pas aisé, à la lumière des résultats obtenus, de développer une méthode de production de semis à partir de graines de résineux ectomycorhizés par *Boletus* et *Lactarius*, en condition non stérile, qui serait alors utilisable par les pépiniéristes.

9. RÉFÉRENCES

Arboquebecium. (s.d.). *Pinus koraiensis*, https://www.arboquebecium.com/fr/produit/pin-de-coree-1/

Gagné, A., Janyl, J.L., Bousquet, J., Khasa D.P., (2006). Ectomycorrhizal fungal communities of nursery inoculated seedlings outplanted on clearcut sites in northern Alberta, *Canadian Journal of Forest Research*, *36*(7), 1684-1694.

Gagnon, Langlois, Fortin, (1988). Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedling as affected by nitrogen fertilization, Inoculum type, and symbiont, *Canadian Journal of Forest Research*, *18*, 922-929.

Godbout, C., Fortin, J.A. (1990). Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grown white pine seedlings, *Mycological Research*, *94*(8), 1051-1058.

Guerin-Laguette, A., Butler, R., Wang, Y., (2020). Advances in the Cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron Milk Cap) in New Zealand. Dans J. Pérez-Moreno, Guerin-Laguette A., Arzu, R. F., Yu, F. Q. Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World. Springer.

Guerin-Laguette, A., Vaario, L.-M., Matsushita, N., Shindo, K., Suzuki, K., La peyrie, F. (2003). Growth stimulation of a Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of *Tricholoma matsutake* on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetable oil. *Mycological Progress, 2*(1), 37-44.

Kreuzinger, N., Podeu, R., Gruber, F., Göbl, F., Kubiceki, C.P. (1996). Identification of Some Ectomycorrhizal Basidiomycetes by PCR Amplification of Their gpd (Glyceraldehy), *Applied and environmental microbiology*, *62*(9), 3432-3438.

Kim, S. S., Lee, J. S., Cho, J. Y., Kim Y. E., Hong, E. K. (2010). Process development for mycelial growth and polysaccharide production in *Tricholoma matsutake* liquid culture, *Journal of* Bioscience and Bioengineering, 109(4), 351-355.

Lamhamedi, M. S., J. A. Fortin, H. H. Kope, Kropp, B.R. (1990). Genetic variation in ectomycorrhiza formation by Pisolithus arhizus on Pinus pinaster and Pinus banksiana, New Phytologist, 115(4), 689-697.

Lamhamedi, M., Renaud M., Auger, I., Fortin, J.-A. (2020). Granular calcite stimulates natural mycorrhization and growth of white spruce seedlings in peat-based substrates in forest nursery. *Microorganisms*, *8*(1088), 1-19.

Lee, W. H., Han, S. K., Kim, B. S., Shrestha, B., Lee, S.Y., Ko, C. S., … Sung, J. M. (2007). Proliferation of *Tricholoma matsutake* mycelial mats in pine forest using mass liquid inoculum, *Mycobiology*, *35*(*2*), 54-61.

Lian, B., Zang, J., ,W., Yuan, S., Smith, DL. (2008)., *Electron. J. Biotechnol., 11*(3), 1-9.

Marx D. H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, *59*(4), 411-417.

Nature-Action Québec. (2015). Guide pratique pour la propagation d'arbres à noix : de la graine à l'arbre. http://nature-action.qc.ca/site/publications/guide-propagation-arbres-a-noix

Olivier, J-M., Guinberteau, J., Rondet, J., Mamoun, M. (1997). Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Revue Forestière Française*, 49(*222*).

Onwuchekwa, N.E., Zwiazek, J.J., Quoreshi, A. & Khasa, D.P. (2014). Growth of mycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) and white spruce (*Picea glauca*) seedlings planted in oil sands reclaimed areas. *Mycorrhiza*, *24*(6), 431-441.

Parladé, J., Pera, J., Luque, J. (2003). Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions, *Mycorrhiza*, *14*(3), 171-176.

Pickard, M.A., Vandertol, H., Roman, R., Vazquez-Duhalt, R. (1999). High production of ligninolytic enzymes from white rot fungi in cereal bran liquid medium. *Can. J. Microbiol*., *45*, 627-631.

Poitou, N., Mamoun, M., Ducamp, M., Delmas, J. (1983). Premiers résultats de fructification in situ d'un bolet mycorhizien comestible en conditions contrôlées. PHM Revue horticole, 239, 45-47.

Rosado, S.C.S., Kropp, B.R., and Piché, Y. (1994). Genetics of ectomycorrhizal symbiosis. II. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal traits. New Phytologist, 126, 111-117.

Saxton, A.M. 1998. A macro for converting mean separation output to letter groupings in Proc Mixed. In Proc. 23rd SAS Users Group Intl., SAS Institute, Cary, NC, pp1243-1246.

Strullu, D.G., Grellier, B., Marciniah, D., Letouzé, R. (1986). Micropropagation of chestnut and conditions of mycorrhizal syntheses in vitro. *New Phytologist*, *102*(1), 95-101.

Wong, K. K. Y., Fortin, J.A. (1989). A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.*, *67*, 1713-1716.

Wong, K. K. Y., Y. Piché, Fortin, J.A. (1990). Differential development of root colonization among four closely, *Symbiosis*, *8*, 197-231.

Yun, W., Hall, I.R., Dixon, C., Hance-Halloy, M., Strong, G., Brass, P. (2002). *The cultivation of Lactarius deliciosus (saffron milk cap) and Rhizopogon rubescens (shoro) in New Zealand*. In

Edible Mycorrhizal Mushrooms and their Cultivation, Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Nouvelle-Zélande.