

Caractérisation des mycorhizes dans des bois de pin d'Alep sur le Sistema Ibérico (Espagne). Résultats préliminaires

Díaz G., Honrubia M., García G., Gutierrez A.

La mycorhization des plantes forestières en milieu aride et semi-aride et la lutte contre la désertification dans le bassin méditerranéen

Zaragoza : CIHEAM

Cahiers Options Méditerranéennes; n. 20

1996

pages 43-50

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=96605777>

To cite this article / Pour citer cet article

Díaz G., Honrubia M., García G., Gutierrez A. **Caractérisation des mycorhizes dans des bois de pin d'Alep sur le Sistema Ibérico (Espagne). Résultats préliminaires.** *La mycorhization des plantes forestières en milieu aride et semi-aride et la lutte contre la désertification dans le bassin méditerranéen*. Zaragoza : CIHEAM, 1996. p. 43-50 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 20)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Caractérisation des mycorhizes dans des bois de pin d'Alep sur le Sistema Ibérico (Espagne)

Résultats préliminaires

G. DIAZ
M. HONRUBIA
G. GARCIA
A. GUTIERREZ
DPTO. BIOLOGIA VEGETAL
FACULTAD DE BIOLOGIA
UNIVERSIDAD DE MURCIA
30100, MURCIA
ESPAGNE

RESUME - On présente des résultats préliminaires d'une étude concernant les populations d'ectomycorhizes en milieu naturel dans deux pinèdes de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Miller) situées dans le Sistema Ibérico, Espagne (Foz de Calanda, province de Teruel et Vallivana, province de Castellón). On a quantifié le nombre et la biomasse des ectomycorhizes et on a déterminé aussi le potentiel d'inoculum mycorhizien au cours d'un bioessai en serre. De plus, on a décrit les types d'ectomycorhizes les plus fréquentes selon des critères morphologiques, provenant autant de conditions naturelles, de bioessais que de prélèvements de mycorhizes sous carpophores. Les résultats montrent, en général, une prédominance des mycorhizes formées par *Suillus*, *Rhizopogon* et *Cenococcum geophilum*.

Mots-clés : *Pinus halepensis*, caractérisation, mycorhizes, potentiel d'inoculum.

SUMMARY - "Mycorrhizae characterization in Aleppo pine forests in the Sistema Ibérico (Spain). Preliminary results". Preliminary results on ectomycorrhizal population in *Pinus halepensis* forests in the Sistema Ibérico are presented. The number and biomass of ectomycorrhizae in natural conditions have been quantified. The mycorrhizal inoculum potential from greenhouse bioassay has also been determined. On the other hand, the most frequent morphological types of ectomycorrhizae from natural conditions, bioassays and by the extraction of mycorrhizae directly under sporocarps have been described. In general, a greater abundance of mycorrhizae formed by *Suillus*, *Rhizopogon* and *Cenococcum geophilum* has been observed.

Key words: *Pinus halepensis*, mycorrhizas characterization, inoculum potential.

Introduction

La morphologie externe des ectomycorhizes (ECHE) est surtout caractérisée par le champignon symbiote, tandis que l'hôte et même le milieu affectent aussi la structure des mycorhizes (Marx et Kozłowski, 1973 ; Agerer, 1987-1993). Le type de ramification, et aussi la morphologie et l'organisation interne des cellules radicales sont déterminées par l'hôte, mais modifiées par le mycosymbiote. D'autre part, les caractères anatomiques et morphologiques du manteau ectomycorhizien sont établis par le champignon. Finalement, des facteurs environnementaux (pH, disponibilité en eau, etc.) peuvent produire des variations dans la morphologie des ECM, couleur, épaisseur du manteau, rhizomorphes, etc.

La caractérisation morphologique et anatomique des ECM est très importante pour des études, par exemple, visant à vérifier la mycorhization contrôlée et les performances du champignon inoculé dans la pépinière et même dans la forêt (Baar et de Vries, 1995 ; Jackson *et al.*, 1995). Il est très important dans le cas des champignons comestibles, comme les truffes, avec lesquels il y a aussi un intérêt économique et commercial particulier (Meotto *et al.*, 1995). Pour les études écologiques, la caractérisation des ECM est aussi très intéressante, pour quantifier le potentiel mycorhizien des sols (Borchers et Perry, 1990 ; Miller *et al.*, 1992 ; Roth et Berch, 1992), pour étudier les changements saisonniers des populations de champignons mycorhizes (Wu *et al.*, 1993), et même pour connaître la diversité morphologique des ECM et finalement la diversité fongique.

Pendant l'été 1991, nous avons commencé l'étude des ECM dans les régions de El Maestrazgo, Els Ports et les montagnes de Gúdar y Javalambre (Sistema Ibérico, Espagne). Un des objectifs du projet était l'étude de la production et diversité des structures ectomycorhiziennes dans différents types de végétation. Il y a très peu d'études de quantification et caractérisation des ECM, en particulier dans les écosystèmes méditerranéens, où il faut souligner quelques caractéristiques bioclimatiques et pédologiques (régime saisonnier des pluies, sécheresse, manque de sol, difficulté de pénétration des racines dans les sols, etc.) qui conditionnent le développement des plantes et de leurs champignons mycorhizes. Dans ce travail, les auteurs présentent les premiers résultats de caractérisation et quantification des mycorhizes dans quelques forêts de *Pinus halepensis*.

Matériel et méthodes

Caractéristiques des sites d'étude

Pour la réalisation de cette étude on a choisi deux sites avec une végétation de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Miller) qui sont situés sur le Sistema Ibérico, Espagne.

La station de Foz de Calanda (Teruel) est située à 580 m d'altitude, avec des coordonnées UTM 31T YL3133. Le sol est de type Calciorthid (Soil Survey Staff, 1992) et sa texture est argilo-sableuse. En ce qui concerne la végétation, il s'agit d'une plantation de pin d'environ 50 ans, avec des espèces très thermophiles appartenant à l'étage mésoméditerranéen.

La station de Vallivana (Castellón) est située à 685 m d'altitude, avec des coordonnées UTM 31T BE5092. Le sol est de type Xerochrept (Soil Survey Staff, 1992) et sa texture est argilo-sableuse. En ce qui concerne la végétation, il s'agit d'une plantation de pin d'environ 70 ans, dans l'étage mésoméditerranéen.

Les résultats des analyses chimiques des sols sont présentés dans la Table 1.

Table 1. Caractéristiques chimiques des sols des stations étudiées

	C org (g kg ⁻¹)	N total (g kg ⁻¹)	C/N	CO ₃ ²⁻ (g kg ⁻¹)	pH (KCl)	C.E. (dSM ⁻¹)
Foz Calanda	28,5	2,81	10,10	488	7,73	0,84
Vallivana	28,9	3,14	9,20	411,9	7,24	0,87

Quantification des ectomycorhizes

Pendant le mois de mars 1994 on a prélevé 10 échantillons cubiques de sol d'environ 1 l de volume, sur une ligne de 100 m de longueur dans chaque site. Les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur traitement. De chaque échantillon on a pris 100 ml, qui sont immergés dans l'eau et qui sont lavés à l'eau sur deux tamis de 1 et 2 mm de maille, après l'élimination de la matière organique et des débris. Le matériel récupéré est étudié à l'aide d'une loupe binoculaire (10-60x). On a évalué le nombre d'ectomycorhizes et leur biomasse (après les avoir séchées à 80°C pendant 16 heures). Les différents types morphologiques d'ectomycorhizes ont été aussi observés, décrits selon leur morphologie et comptés.

Bioessais

Pendant le mois de mars 1994 on a prélevé 10 échantillons de sol jusqu'à une profondeur d'environ 30 cm, dans chaque site. Les échantillons ont été mélangés et passés sur un tamis de 1 cm de maille pour éliminer les pierres et les débris organiques grossiers. Pour effectuer le test biologique on a préparé six dilutions d'ordre 10. Pour ce faire, on a mélangé le sol naturel avec un mélange 1 : 1 (v/v) de sol/vermiculite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 60 min. On a rempli des conteneurs (Forest pot®) de 300 ml qui ont été semés avec des semences de *Pinus halepensis* stérilisées pendant 30 min avec H₂O₂. Après six mois de croissance on a prélevé cinq semis de chaque dilution. Sur chaque plante, on a compté le nombre de bouts totaux et de ceux qui étaient mycorhizés, afin d'évaluer le pourcentage de racines mycorhizées. De plus, on a décrit et caractérisé les types morphologiques des mycorhizes qui prédominaient.

Pour nous rapprocher de l'identification des champignons ectomycorhiziens, des essais d'isolement ont été réalisés à partir des mycorhizes sur milieu MMN gélosé (Marx, 1969). Pour ce faire, des racines courtes mycorhizées sont lavées à l'eau distillée et Tween 80 et après sont stérilisées en surface avec H₂O₂ 30 vol pendant 30 min, suivi d'un autre lavage avec de l'eau stérilisée. Les mycélia ainsi obtenus sont décrits et comparés avec des cultures de souches fongiques obtenues à partir de carpophores.

Prélèvement des mycorhizes sous carpophores

Pendant la saison de fructification on a fait des prélèvements sous les carpophores

des espèces fongiques les plus fréquentes. On a suivi les rhizomorphes et les cordons mycéliens pour établir la relation entre carpophores et mycorhizes. Plusieurs échantillons de racines ont été prélevés sous des carpophores d'une même espèce afin de pouvoir vérifier leur forme mycorhizienne. Les mycorhizes sont nettoyées sur le terrain et placées dans un fixateur (glutaraldéhyde 2% dans un tampon phosphate, ou FAA). D'autres échantillons sont gardés dans le sol dans des sacs de plastique hermétiques fermés et réfrigérés jusqu'à leur étude.

Pour la description et caractérisation on a suivi les critères d'Agerer (1987-1995) et Ingelby *et al.* (1990). On a considéré la couleur, le type de ramification, la forme, longueur et diamètre des terminaisons non ramifiées. Par ailleurs on a décrit la surface du manteau fongique et la présence de rhizomorphes, leur couleur, forme et connexion au manteau, ainsi que la description des hyphes, etc.

Résultats et discussion

Quantification des ectomycorhizes

Le nombre de racines courtes mycorhizées et leur biomasse, ainsi que le nombre de types morphologiques pour les deux sites étudiés est montré en Table 2. On a observé une plus grande production d'ectomycorhizes sur Vallivana.

Table 2. Nombre et biomasse de racines courtes mycorhizées dans les stations étudiées

	Foz de Calanda	Vallivana
Racines courtes mycorhizées (No./l sol)	77	172
Biomasse des mycorhizes (g/l sol)	26,4	60,9
Nombre de types morphologiques	3	4
Types morphologiques	I, II, III	I, II, IV, V

Les valeurs sont la moyenne de dix répétitions

La description morphologique sommaire des morphotypes est la suivante :

Type I. *Cenococcum geophilum*. Mycorhizes simples quelquefois dichotomiques. Couleur noire intense et brillante. Apex non ramifiés droits. Manteau lisse, de 35 µm d'épaisseur. Avec des hyphes émergents de couleur noire. La structure du manteau est pseudoparenchymateuse, formé par des hyphes disposés de façon étoilée.

Type II. Noir. Mycorhizes dichotomiques. Couleur noire. Apex non ramifiés droits, avec un diamètre de 400 μm . Manteau à surface granuleuse de 30-40 μm d'épaisseur et structure pseudoparenchymateuse en réseau. En coupe transversale le manteau est constitué par des hyphes isodiamétriques.

Type III. Brun-orangé. Mycorhizes dichotomiques simples et composées. Couleur orange à brun-orangé. Apex non ramifiés droits avec un diamètre de 375 μm . La surface du manteau est couverte partiellement d'un mycélium cotonneux lâche. L'épaisseur du manteau est de 30 μm et la structure pseudoparenchymateuse. Hyphes extramatriciels de 2,5 μm de diamètre.

Type IV. Brun-ocre. Mycorhizes dichotomiques simples et composées. Couleur brun-ocre. Apex non ramifiés droits ou légèrement incurvés et avec un diamètre de 377-400 μm . Manteau lisse et quelquefois avec des hyphes émergents. L'épaisseur du manteau est de 30 μm et la structure plectenchymateuse. Hyphes extramatriciels de 2,5 μm de diamètre.

Type V. Mycorhizes dichotomiques simples et composées. Couleur grisâtre. Apex non ramifiés sinueux, de 425 μm de diamètre. Manteau lisse ou localement formé par une laine d'hyphes hyalins et de 45 μm d'épaisseur.

Bioessais

Les bioessais en serre indiquaient que le potentiel d'inoculum mycorhizien était légèrement supérieur dans la station de Vallivana par rapport à celle de Foz de Calanda, ce qui est similaire aux résultats antérieurs. Avec le sol non dilué, le pourcentage de mycorhization est presque de 100% pour Vallivana et un peu inférieur à 75% dans le cas de Foz de Calanda. C'est cette station où on trouve un pourcentage de colonisation zéro à une plus petite dilution du sol (Fig. 1). Le morphotype le plus commun était du type ectendomycorhizien, formé par des champignons nommés E-strain. Ces champignons sont très fréquents dans les conditions de serre, où on travaille avec des plantules très jeunes (Danielson et Visser, 1989 ; Egger et Fortin, 1990). Ce sont des champignons précoces dans ces conditions, mais nous n'avons pas trouvé ces champignons dans les conditions de champ. L'abondance des ectendomycorhizes du type E-strain fait que les pourcentages de mycorhization étaient très élevés.

Dans les deux localités on a observé les mêmes morphotypes :

Type A. E-strain. Mycorhizes depuis simples jusqu'à dichotomiques, stipitées. Couleur brun clair ou brun rougeâtre. Le manteau est normalement absent et quand il est présent il est faible. Quelquefois avec des hyphes extramatriciels, pigmentés.

Type B. Possible *Suillus*. Mycorhizes simples, dichotomiques et coralloïdes. La couleur est blanche à blanchâtre avec un dense manteau cotonneux, argenté dans l'eau qui couvre plusieurs dichotomies et la surface de la racine. Sa structure est plectenchymateuse. Avec des cordons mycéliens formés par l'agrégation des hyphes du manteau.

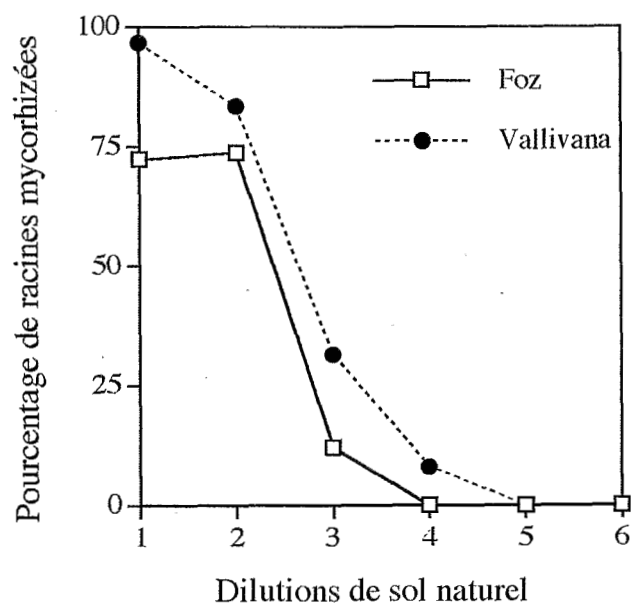


Fig. 1. Pourcentage de mycorhization des systèmes racinaires de pin d'Alep âgés de six mois au cours d'un bioessai en serre avec différentes dilutions de sol naturel (dilutions 1 = 1 : 1 ; 2 = 1 : 10 ; 3 = 1 : 10² ; 4 = 1 : 10³ ; 5 = 1 : 10⁴ et 6 = 1 : 10⁵).

A partir des isolats des mycorhizes du type B on a obtenu trois cultures différentes, les trois ressemblant à des cultures appartenant au genre *Suillus*, quand elles ont été comparées avec des isolats de collection.

La comparaison entre ces cultures et des cultures de collection permettraient la confirmation de l'existence de mycorhizes formées par le genre *Suillus*. Cependant, le fait d'obtenir des cultures différentes provenant du même type morphologique de mycorhize montre que des espèces diverses de champignons mais appartenant au même genre peuvent former des mycorhizes très ressemblantes.

Il faut souligner qu'il n'y a pas de relation exacte entre les morphotypes trouvés sur le terrain et ceux des bioessais. Donc on doit considérer les résultats obtenus dans les bioessais comme une approche à la connaissance du potentiel infectif des sols, parce que les conditions sont très différentes et la croissance de quelques champignons est favorisée dans les conditions de serre. A ce sujet, les mycorhizes formées par *Cenococcum geophilum*, qui étaient les plus fréquentes dans les conditions naturelles, ainsi que leurs sclerotia (García *et al.*, 1996), n'ont pas été trouvées dans les bioessais. D'autre part, les ectomycorhizes formées par *Suillus* sont relativement fréquentes dans les conditions de bioessais et sur le terrain.

Prélèvement des mycorhizes sous carpophores

On a décrit les mycorhizes formées sur le pin d'Alep et les champignons suivants :

Amanita gracilior Bas et Honrubia

Mycorhizes dichotomiques. Couleur brun-ocre. Apex non ramifiés droits, de 450 µm de diamètre. Le manteau est lisse, de 45 µm d'épaisseur et structure plectenchymateuse vers l'extérieur et pseudoparenchymateuse vers l'intérieur. Il y a des hyphes émergents pluricellulaires de 5x40 µm. Mycélium extramatriciel faible.

Rhizopogon roseolus (Corda) Th M Fri

Mycorhizes dichotomiques simples, ramifiées, à coralloïdes. Couleur brun clair. Apex non ramifiés droits, de 450 µm de diamètre. Surface du manteau cotonneuse, de couleur rosée qui donne lieu à des rhizomorphes avec les marges velues de couleur brun-rosé. L'épaisseur est de 45 µm et la structure plectenchymateuse avec des hyphes inclus dans une matrice gélatineuse.

Suillus collinitus (Fri.) Kuntze

Mycorhizes depuis simples, dichotomiques à coralloïdes. Couleur brun clair avec des apex de couleur crème. Apex non ramifiés de 2 mm de longueur et 450 µm de diamètre, droits. Surface du manteau cotonneuse, avec quelques hyphes émergents. Manteau de 30 µm d'épaisseur et structure plectenchymateuse. Avec des rhizomorphes et cordons mycéliens de couleur blanche.

Conclusions

Il faut souligner l'importance d'utiliser différentes techniques pour étudier et arriver à la connaissance des populations mycorhiziennes, dans les aspects quantitatifs et qualitatifs. Dans les écosystèmes méditerranéens, en particulier avec la végétation de pin d'Alep, le prélèvement des mycorhizes directement sous les carpophores ou dans les carrés de sol est très difficile dû aux conditions pédologiques (manque de sol) ; alors la caractérisation des mycorhizes est difficile à bien faire. D'autre part, dans les bioessais en serre, les conditions sont très différentes et permettent que d'autres populations de champignons soient favorisées.

Finalement, il faut faire la différence entre les concepts de caractérisation et identification des symbiotes fongiques et la nécessité d'être prévoyant au moment de l'identification au travers de la caractérisation des mycorhizes. Néanmoins on peut conclure que dans les forêts de pin d'Alep étudiées, les ectomycorhizes les plus fréquentes correspondent à celles de *Suillus*, *Rhizopogon* et *Cenococcum*.

Références

- Agerer, R. (1987-1995). *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag, Munich.
- Baar, M. et de Vries, F.W. (1995). Effects of manipulation of litter and humus layers on ectomycorrhizal colonization potential in Scots pine stands of different age. *Mycorrhiza*, 5 : 267-272.

- Borchers, S.L. et Perry, D.A. (1990). Growth and ectomycorrhiza formation of Douglas-fir seedlings grown in soils collected at different distances from pioneering hardwoods in southwest Oregon clear-cuts. *Can. J. For. Res.*, 20 : 712-721.
- Danielson, R.M. et Visser, S. (1989). Host response to inoculation and behaviour of introduced and indigenous ectomycorrhizal fungi of jack pine grown on oil-sands tailings. *Can. J. For. Res.*, 19 : 1412-1421.
- Egger, K.N. et Fortin, J.A. (1990). Identification of taxa of E-strain mycorrhizal fungi by restriction fragment analysis. *Can. J. Bot.*, 68 : 1482-1488.
- García, G., Díaz, G., Honrubia, M., Torres, P. Sánchez, F. et Pérez, P. (1996). Dynamics of Ectomycorrhizal Populations in the Mediterranean Forest of the Sistema Ibérico Mountains. Dans : *Mycorrhizae in Integrated systems. From Genes to Plant Development*, Azcón-Aguilar, C. et Barea, J.M. (éds.). Granada, Spain (sous press).
- Ingelby, K., Mason, P.A., Last, F.T. et Fleming, L.V. (1990). *Identification of ectomycorrhizas*. Institute of Terrestrial Ecology, publication No. 5, London.
- Jackson, R.M., Walker, C., Luff, S. et McEvoy, C. (1995). Inoculation and field testing of Sitka spruce and Douglas fir with ectomycorrhizal fungi in the United Kingdom. *Mycorrhiza*, 5 : 165-174.
- Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of ectomycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59 : 153-163.
- Marx, G.C. et Kozlowski, T.T. (éds) (1973). *Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology*. Academic Press, New York.
- Meotto, F., Nosenzo, C. et Fontana, A. (1995). Le micorrize delle specie pregiate di Tuber. *L'Informatore Agrario*, 31 : 41-45.
- Miller, S.L., Koo, C.D. et Molina, R. (1992). Early colonization of red alder and Douglas fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza*, 2 : 53-61.
- Roth, A.L. et Berch, S.M. (1992). Ectomycorrhizae of Douglas-fir and western hemlock seedlings outplanted on eastern Vancouver Island. *Can. J. For. Res.*, 22 : 1946-1955.
- Soil Survey Staff (1992). *Keys to soil taxonomy*. USDA, Virginia.
- Wu, Y., Gale, M.R., Cattelino, P.J., Richter, D.L. et Bruhn, J.N. (1993). Temporal dynamics of ectomycorrhizal populations and seedling characteristics on red pine (*Pinus resinosa*). *Can. J. For. Res.*, 23 : 810-815.