CIHEAM
Options Méditerranéennes

Evaluation de la mycorhization en pot et en pleine terre : principes de réglementation

Tagliaferro F.

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 63-73

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

---

http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=96605779

To cite this article / Pour citer cet article

Tagliaferro F. **Evaluation de la mycorhization en pot et en pleine terre : principes de réglementation.** *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. 63-73 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 20)

CIHEAM

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

CIHEAM

Evaluation de la mycorhization en pot et en pleine terre : principes de réglementation

F. TAGLIAFERRO
ISTITUTO PER LE PIANTE DA LEGNO E L'AMBIENTE
IPLA S.p.a.
CORSO CASALE, 476
10132 TORINO
ITALIE

RESUME - Le contrôle et la certification de la mycorhization des plants forestiers sont nécessaires et urgents, étant donné les échanges internationaux de matériel de propagation. A niveau scientifique la méthodologie doit s'adapter aux objectifs de l'expérience, et la littérature nous fournit des références ; pour la production commerciale il faut définir une méthode rigoureuse mais assez simple et généralement agréée. On présente ici la méthode étudiée par plusieurs régions italiennes pour le contrôle des plants mycorhizés par *Tuber* sp.

Mots-clés : Plants mycorhizés, contrôle, méthodologie.

SUMMARY *- "Mycorrhizae control in pots and on the field: Principles and regulations". The control and certification of mycorrhizal infection on forest seedlings is a necessary and urgent requirement as international trade of propagation material is getting more and more frequent. At a scientific level, the methodology employed must be adapted to the research objectives. For commercial productions of seedlings it is important to define an exact control method yet simple to apply and generally accepted. The paper describes a methodology studied by some Italian regional administrations to control and certify seedlings infected by* Tuber *sp.*

Key words*: Mycorrhizal seedlings, control, methodology.*

Les raisons du contrôle de la mycorhization

L'exigence de vérifier la présence et l'intensité de la mycorhization sur les plants forestiers vient de la constatation de l'importance de cette symbiose pour la réussite des reboisements en milieu défavorable. La méthode suivie pour le contrôle a été perfectionnée avec le temps et le progrès des connaissances sur la biologie des arbres et des champignons symbiotes et grâce à la vérification des résultats des plantations expérimentales.

L' IPLA à Turin s'occupe de ces problèmes depuis les années cinquante. D'abord l'étude était appliquée exclusivement à la sylviculture, l'Istituto Nazionale per le Piante da Legno, prédécesseur de l'IPLA, étudiant l'introduction et la culture des espèces exotiques à croissance rapide pour la production de bois. L'expérimentation intégrée comprenait des pépinières en pleine terre où on vérifiait la présence de champignons mycorhiziens par rapport au développement des semis et aux facteurs écologiques (Fassi, 1967).

A ce moment-là on a pu montrer que le milieu influençait la formation de mycorhizes sur certaines plantes qui rencontraient des difficultés à faire pénétrer leurs racines profondément dans le terrain compact de la pépinière, ce qui confirmait l'existence d'une interaction très étroite champignon-plante-milieu.

Les expériences qu'on a conduit récemment dans les pépinières forestières de la vallée d'Aoste ont confirmé que l'inoculation des semis en pleine terre donnait de bons résultats, mais le choix du symbiote était décisif pour la croissance initiale des semis ; donc si la production est destinée aux reboisements il est indispensable de choisir correctement le champignon symbiote car les arbres qui ont le plus grand développement initial gardent une croissance rapide les années qui suivent (Marx *et al.*, 1991).

Dans la phase de mise en place, d'autres champignons mycorhiziens s'établissent, étant naturellement présents dans le sol, qui peuvent substituer avec succès les symbiotes initiaux car ils représentent la succession naturelle de la mycoflore symbiote par rapport à l'âge de la plante et aux modifications des conditions du milieu liées à son développement.

Evidemment dans le cas des champignons comestibles l'évolution de la mycorhization vers d'autres symbiotes a des conséquences négatives, le but de cette culture étant d'obtenir une production élevée de corps fructifères et prolongée autant que possible dans le temps. Même dans ce cas il est donc important d'observer et d'évaluer la dotation de mycorhizes de l'arbre, en pépinière et après la mise en place, pour comprendre les résultats de nos expériences et pour mieux connaître l'évolution des processus naturels.

En outre puisqu'il paraît que la quantité de mycorhizes d'une espèce fongique déterminée soit en rapport avec la production de carpophores (Bencivenga *et al.*, 1992), il convient que l'évaluation de la mycorhization des plantes commerciales vendues à prix élevé pour la production de champignons comestibles, corresponde à une estimation de qualité.

Pourtant le champignon et le plant mycorhizé doivent bien s'adapter au milieu de mise en place pour qu'ils puissent croître au maximum de leurs potentialités. Considérant la même espèce, l'adéquation du milieu diffère selon le patrimoine génétique de l'individu et ceci peut donner des résultats inégaux. Les cultures agricoles donnent quelques exemples facilement compréhensibles de ce phénomène là où la sélection génétique permet d'obtenir des résultats extraordinaires à condition qu'on choisisse la variété la plus indiquée pour la région. Evidemment cette considération est valable en principe même pour les plantes à bois et leur champignons symbiotes ; on est en train d'étudier à niveau international les espèces fongiques qui optimisent la croissance des arbres forestiers en des milieux déterminés, et on est en train de sélectionner des souches fongiques qui soient indiquées pour la production d'inoculum, à mycorhization rapide et valides pour la croissance future de l'arbre. En même temps on se dédie à la recherche de peuplements et d'arbres de bonne qualité, on individualise les peuplements producteurs de graines et les arbres d'élite pour les multiplier.

Si on ne peut pas renoncer à perpétuer la biodiversité, de toute façon la sélection de souches et de clones, et le mariage des meilleures qualités des deux entités symbiotes plante-champignon, pourrait dans le futur, après avoir effectué les expériences nécessaires, aboutir à une meilleure réussite des reboisements en milieux extrêmes et de l'arboriculture à bois.

Les raisons pour un contrôle de la mycorhization sont donc évidentes du point de vue scientifique, pratique et économique ; l'intensité et la nature de la mycorhization des semis étant si importantes pour la production forestière en pépinière.

A cause des échanges transfrontaliers soit d'expériences soit de matériel de multiplication, qui sont devenus désormais nombreux et habituels, les contrôles doivent être réglementés.

Pour des buts expérimentaux et de recherche, quand il s'agit d'expériences innovatrices, la méthodologie doit s'adapter aux objectifs et aux circonstances, bien qu'en respectant des principes statistiques ; pour ce qui concerne l'évaluation de la mycorhization des lots commerciaux les temps sont mûrs pour la définition d'une méthodologie standardisée à cause des conséquences économiques et même juridiques de cette certification de qualité.

Méthodologie de contrôle

Le contrôle de la mycorhization se réalise selon les phases suivantes : échantillonnage des plants ; et identification et quantification des ectomycorhizes présentes.

Echantillonnage

C'est une phase très délicate puisqu'il faut examiner un échantillon représentatif tout en réduisant les temps et les coûts de l'opération.

Pour les productions en pot, il faut d'abord identifier des lots homogènes de plants quant aux caractéristiques culturales, et après il faut établir un pourcentage minimal d'échantillonnage, casuel ou systématique, selon les possibilités. Comme la mycorhization favorise le développement des plants, un échantillonnage casuel devrait essentiellement considérer les plants à développement moyen ou même des échantillons équitablement répartis entre les différentes classes dimensionnelles présentes.

Pour les productions en pleine terre, il s'agit d'établir le seuil de signification, en décidant le pourcentage minimal de contrôle tandis que les modalités d'échantillonnage s'adapteront aux conditions de la plantation (numéro et longueur des rangées, prélèvement de plants individuels ou de groupes de semis, etc.).

Dans le cas de semis mis en place il faut aussi établir un seuil d'échantillonnage et respecter des méthodes objectives de prélèvement pour assurer la représentativité des échantillons. Les méthodologies employées le plus souvent sont décrites par les

publications scientifiques (Chevalier, 1979 ; Bencivenga *et al.*, 1987 ; Fiche 1), et leur application doit être adaptée, par des variations ou des stratifications, aux caractéristiques de la plantation et aux objectifs poursuivis.

Identification et quantification des champignons ectomycorhiziens présents

La caractérisation et, si possible, la détermination des champignons ectomycorhiziens est la condition préalable à toute évaluation successive, puisque chaque symbiose va réagir de façon différente au milieu de mise en place. Cette phase est exécutée par des observations au microscope qui permettent de distinguer des différences minimales de la forme des apex. Il faut être des experts car le même champignon peut produire une mycorhization très variée selon l'âge des mycorhizes et la nature de l'hôte.

Pour identifier sans ambiguïté les espèces fongiques qui forment des mycoclènes très similaires, on est en train d'expérimenter de nouvelles techniques biochimiques et biomoléculaires. Dans le premier cas on a presque mis au point une technique pour vérifier la correspondance entre les protéines enzymatiques présentes dans les mycorhizes à identifier et celles des corps fructifères du champignon (gène-enzyme). Il s'agit de techniques qu'on peut appliquer avec succès exclusivement quand on connaît le petit groupe de champignons auxquels les mycorhizes pourraient se référer.

Le contrôle des champignons ectomycorhiziens présents peut être réalisé sur le système racinaire entier ou sur des parties du système racinaire par une estimation visuelle et l'attribution d'un indice de présence, ou même par comptage direct au microscope binoculaire stéréoscopique. L'opération naturellement peut être conduite pour chaque champignon ectomycorhizien ou pour leur totalité.

Quand le système racinaire est bien développé, par exemple celui des semis (feuillu) cultivés en pot, l'estimation visuelle est la solution la plus pratique et donne des résultats assez précis pour l'évaluation du matériel de multiplication destiné aux reboisements ; tandis qu'on réserve le comptage direct des apex mycorhizés aux expériences scientifiques car il est bien plus coûteux.

Cette dernière méthode à été suggérée aussi pour la vérification du matériel le plus précieux (par exemple plants mycorhizés par des champignons comestibles, les truffes surtout). Pour faciliter le travail de comptage, autrement long et contraignant, on a proposé des systèmes de sous-échantillonnage des racines par rapport au système racinaire entier (Fiche 2), qui respectent une certaine standardisation tout en tenant compte des dimensions des plants et de leurs systèmes racinaires qui en conditionnent l'application (Bencivenga *et al.*, 1987 ; Marx, 1990).

Présentation de la méthode mise au point par les experts italiens pour l'évaluation des plants mycorhizés par les champignons du genre *Tuber*

Depuis quelques années la nécessité de contrôler et certifier les plants truffiers produits par les pépiniéristes est devenue urgente à cause de la distribution sur le

marché de matériel de qualité médiocre ou peu certaine à des prix très élevés, ce qui a parfois des implications légales quand la production espérée ne se réalise pas.

Le contrôle devrait se baser sur l'évaluation du matériel initial (plants mycorhizés) et des potentialités de production truffière.

En 1987 une première méthode a été proposée par le Ministère de l'Agriculture et des Forêts Italien, et rédigée collégialement par les experts des plus importantes Institutions qui travaillent dans ce domaine. Cette méthode qui sauvegarde une standardisation maximum et la possibilité d'interpréter les données du point de vue statistique, prévoyait le comptage de nombreux apex racinaires pour chaque plant examiné ; à cause de cela elle était trop coûteuse pour l'appliquer à des contrôles routiniers.

Ensuite les régions italiennes les plus intéressées par la trufficulture prirent l'initiative de convoquer un nouveau groupe d'experts dont faisaient partie plusieurs experts qui avaient déjà contribué à rédiger la méthode précédente. Récemment ils sont parvenus à un accord sur une méthode qui représente le document le plus avancé existant actuellement à ce sujet. Il n'a pas encore été adopté par toutes les régions italiennes.

Après tous les contrôles de laboratoire nécessaires et après avoir comparé les résultats avec ceux de la méthode employée auparavant, on a décidé de réduire le nombre d'apex à compter et on a aussi modifié la technique d'échantillonnage de chaque système racinaire.

Cette nouvelle méthode se compose des phases suivantes :

Identification des mycorhizes

Après avoir lavé soigneusement et délicatement les racines on procède à l'identification des mycorhizes présentes du point de vue morphologique, sur la base des indications bibliographiques.

Evaluation de l'intensité de mycorhization des plants

On considère les deux secteurs du système racinaire, proximal et distal (Fig. 1), et on prélève complexivement 8 échantillons racinaires suivant un schéma fixe (Fig. 2), puis on compte sur chaque échantillon les premiers 50 apex en séparant : (i) les apex mycorhizés par l'espèce de *Tuber* introduite et déclarée par le pépiniériste ; (ii) les apex mycorhizés par d'autres espèces fongiques adventices ; et (iii) les apex non mycorhizés.

Les données en pourcentage sont calculées pour chaque secteur et pour le système racinaire entier (pour le plant) selon une fiche spécialement disposée (Fiche 3). Les limites d'acceptabilité proposées pour certifier un plant mycorhizé sont : (i) 30% de mycorhizes du *Tuber* déclaré ou plus ; (ii) moins de 15% de mycorhizes adventices ; (iii) la différence entre le pourcentage de mycorhizes du *Tuber* déclaré et le pourcentage de mycorhizes adventices doit être égale ou supérieure à 20 ; et (iv) les caractéristiques forestières du plant doivent respecter le normes établies par la Communauté Européenne.

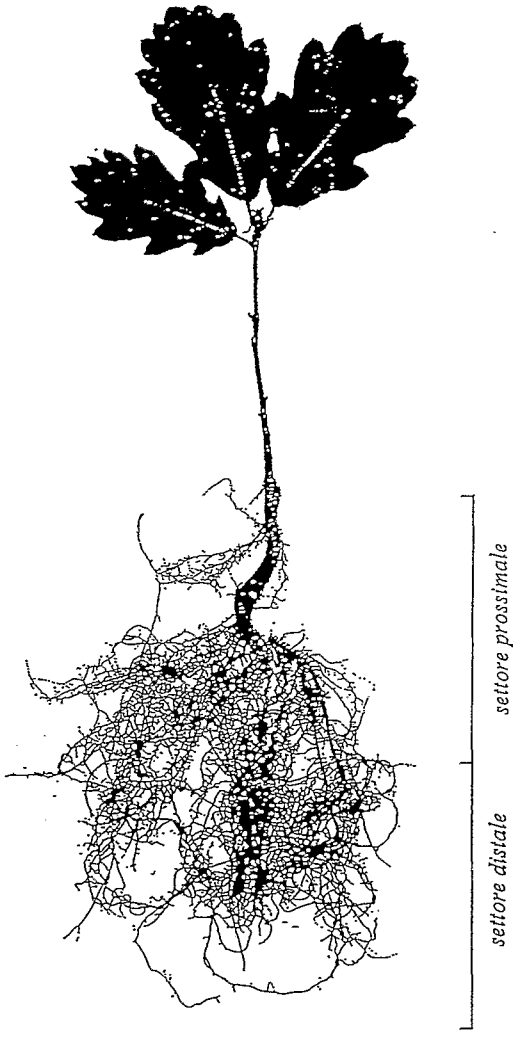

Fig. 1. Plant de *Quercus pubescens* dont le système racinaire a été réparti en deux secteurs, proximal et distal, de même longueur.

Evaluation d'un lot de plants mycorhizés

L'évaluation doit se référer à un lot homogène c'est-à-dire formé par des plants de la même espèce, du même âge, multipliés, inoculés (pendant 10 jours) et cultivés suivant la même méthode. L'échantillonnage doit comporter un prélèvement de 10 exemplaires minimum, et devient 1% pour des lots homogènes de plus de 1000 plants. L'échantillonnage doit de préférence être effectué en automne et les analyses à suivre sous peu.

Le résultat doit être indiqué sur une deuxième fiche et on considère ce jugement valable pour la saison qui suit quand on mettra en place les plants du lot examiné.

Si on remarque une grande disparité entre les pourcentages de mycorhization, aussi sur le même plant, il faut intensifier l'échantillonnage (Fiche 4).

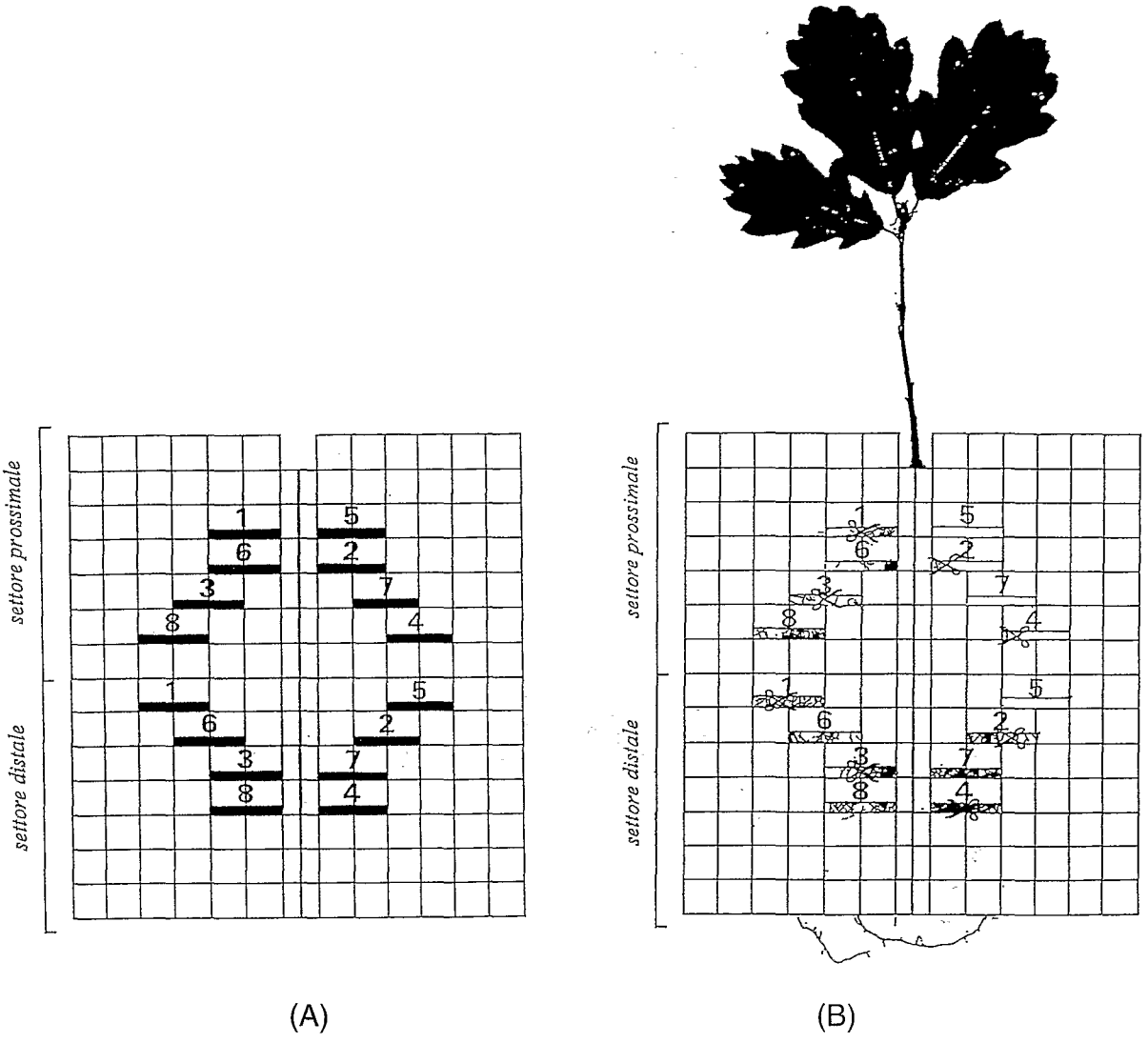

Fig. 2. (A) Modèle à utiliser pour un prélèvement casuel des racines à analyser. En correspondance des bandes noires il faut ouvrir des fentes. On conseille de réaliser ce réseau sur une feuille plastifiée non transparente pour ne pas conditionner l'échantillonnage. Ce modèle peut être vérifié selon la conformation du système racinaire de l'espèce à examiner en déplaçant la position des fentes. (B) Modalité de superposition du réseau sur la plant à examiner. Modalité de prélèvement des racines mycorhizées à analyser : on lave soigneusement et délicatement le système racinaire du plant, on l'étend sur le plan de travail et on pose délicatement sur les racines une feuille de papier plastifié quadrillée et découpée à fentes (A) comme indiqué en (B). Pour chacun des deux secteurs du système racinaire, par l'insertion de petits ciseaux dans les fentes 1, 2, 3 et 4 on coupe la racine la plus proche du point central. La racine coupée doit être défilée avec des pincettes sans enlever la feuille de couverture. Si dans un secteur, en correspondance des points numérotés 1, 2 3 et 4 il n'y a pas de racines on peut prélever les racines qu'on trouve en correspondance des points 5, 6, 7 et 8 du même secteur. Si on désire augmenter l'échantillon on peut prélever les racines aussi en correspondance des points 5, 6, 7 et 8.

Références

Bencivenga, M., Granetti, B., Govi, G., Pacioni, G., Palenzona, M., Tocci, A., et Zambonelli, A. (1995). Presentazione del metodo di valutazione delle piante micorrizate con funghi del genere Tuber basato sulla caratterizzazione morfologica delle micorrize. (Inédit).

Bencivenga, M., Donnini, D. et Di Massimo, G. (1992). Analisi delle micorrize di una tartufaia coltivata di Tuber melanosporum undici anni dopo l'impianto. *Micologia e Vegetazione Mediterranea*, VII(1) : 159-171.

Bencivenga, M., Ferrara, A.M., Fontana, A., Granetti, B., Gregori, G., Lo Bue, G., Palenzona, M., Rebaudengo, E., Tocci, A. et Zambonelli, A. (1987). *Valutazione dello stato di Micorrizazione in piantine tartufigene. Proposta di un metodo.* Ministero Agricoltura e Foreste, Roma.

Chevalier, G. Dans : Giraud, H. (1979). *Etude comparative des mycorhizes d'arbres producteurs de truffes ou non en zone truffière.* Mémoire de fin d'études, ENSA, Rennes.

Fassi, B. (1967). Recherches sur les mycorhizes dans les pépinières de résineux en sols agricoles. *Actes - XIV Iufro Kongress*, Section 24, Munchen.

Granetti, B. et Angelini, P. (1992). Competizione tra alcuni funghi ectomicorrizici e Tuber melanosporum in una tartufaia coltivata. *Micologia e Vegetazione Mediterranea*, VII(1) : 173-188.

Gregori, G.L., Lo Bue, G. et Maggiorotto, G. (1988). Caratterizzazione di ectomicorrize in tartufaie naturali e di impianto e valutazione della loro competitività nei confronti di Tuber magnatum. *Actes du II Convegno Internazionale sul Tartufo*, Spoleto.

Fiche 1. Nombre d'apex (a_t) contrôlés selon la méthode proposée par Bencivenga *et al.* (1987)

Espèce	a_t
Cistus incanus	350
Corylus avellanua	1100
Ostrya carpinifolia	1100
Populus alba	1000
Populus nigra	1100
Quercus cerris	1000
Quercus petraea	1000
Quercus pubescens	800
Quercus robur	1100
Salix spp.	1100
Tilia spp.	900

Fiche 2. Modèle de fiche employée pour l'évaluation de l'indice de mycorhization d'un plant. La valeur de a_t dépend de l'espèce hôte

Date du Contrôle ...../...../...
Plant No. ..... Lot No. .....
Comprenant No. ..... plants L'échantillon est constitué par No ..... plants.
Espèce hôte .....
Espèce du champignon symbiote inoculé .....

Méthode de multiplication
☐ Semis
☐ Bouture
☐ Mériculture
.....

Méthode d'inoculation
☐ Sporale
☐ Petits morceaux de carpophore
☐ Contact racinaire
.....

Date de la multiplication ...../...../.... Date de l'inoculation ...../...../....

	Mycor. par l'inoculum	Mycor. adventices
Secteur proximal	.....	.....
Secteur moyen	.....	.....
Secteur distal	.....	.....
Total	a_m = ...	a_i = ...

$$I_m = \frac{5' a_m - 10 a_i}{a_t} = \frac{5 \times ..... - 10 \times .....}{.....} = ...$$

Fiche 3. Fiche d' évaluation d'un plant mycorhizé

Date..... Plant No. ..... Lot No. .....
Nombre de plants dans le lot .....
Espèce hôte .....
Espèce de *Tuber* déclarée .....

Méthode de multiplication
☐ semis
☐ bouture
☐ méristème

Méthode d'inoculation
☐ sporale
☐ contact racinaire
☐ micéliale

Date de multiplication ..... Date d'inoculation .....
Evaluation du point de vue forestier : Hauteur .....
Diamètre de la tige à la base .....
Longueur du système racinaire .....
Notes .....

	Mycorhizes du Tuber déclaré No. %	Mycorhizes d'autres Champignons No. %	Apex non mycorhizés No. %
Secteur proximal			
1°	.....	.....	.....
2°	.....	.....	.....
3°	.....	.....	.....
4°	.....	.....	.....
Moyenne	.....	.....	.....
Secteur distal			
1°	.....	.....	.....
2°	.....	.....	.....
3°	.....	.....	.....
4°	.....	.....	.....
Moyenne	.....	.....	.....
Moyenne pour le plant entier	.....	.....	.....

Fiche 4. Fiche d'évaluation d'un lot

Date..... Lot No.....
No. de plants du Lot .....No. de plants analysés .....
Espèce hôte.....
Espèce de Tuber déclarée .....

Méthode de multiplication
☐ semis
☐ bouture
☐ méristème

Méthode d'inoculation
☐ sporale
☐ contact racinaire
☐ micéliale

Date de multiplication ..... Date d'inoculation .....
Evaluation de la pépinière

Plant No.	Hauteur de la tige cm	Longueur des racines cm	*Diamètre* de la tige à la base mm	*Mycorhizes* du *Tuber* déclaré %	*Mycorhizes* adventices %	Apex non mycorhizés %
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15 etc						

Jugement complexif
.....
....