

Structure génétique chez la truffe noire du Périgord *Tuber melanosporum* à l'échelle d'une truffière expérimentale



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Janvier 2012 - Juillet 2012

Stage de fin d'études effectué sous l'encadrement de :

Francis Martin, Directeur de Recherche, UMR Interactions Arbres Microorganismes, INRA Champenoux  
Claude Murat, Ingénieur de Recherche, UMR Interactions Arbres Microorganismes, INRA Champenoux

Structure génétique chez la truffe noire du  
Périgord *Tuber melanosporum* à l'échelle d'une  
truffière expérimentale

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Janvier 2012-Juillet 2012

Stage de fin d'études effectué sous l'encadrement de :

Francis MARTIN, Directeur de Recherche, UMR Interactions Arbres Microorganismes, INRA Champenoux  
Claude MURAT, Ingénieur de Recherche, UMR Interactions Arbres Microorganismes, INRA Champenoux

Emila AKROUME  
20<sup>ème</sup> promotion  
2009-2012

Août 2012

## FICHE SIGNALÉTIQUE D'UN TRAVAIL D'ÉLÈVE DE LA FIF

Formation des ingénieurs forestiers d'AgroParisTech-ENGREF	<b>TRAVAUX D'ÉLÈVES</b>
TITRE : Structure génétique chez la truffe noire du Périgord <i>Tuber melanosporum</i> à l'échelle d'une truffière expérimentale	Mots clés : truffe noire, trufficulture, génétique des populations, reproduction sexuée, ascomycète
AUTEUR(S) : Emila AKROUME	Promotion : 20
Caractéristiques : volume ; 50 pages ; figures ; bibliographie.	

### CADRE DU TRAVAIL

ORGANISME PILOTE OU CONTRACTANT : UMR Interactions Arbres Microorganismes, INRA Champenoux (54)		
Nom du responsable : Francis Martin Fonction : Directeur de Recherche		
Nom du correspondant ENGREF (pour un stage long) : Mériem Fournier		
Tronc commun <input type="checkbox"/>	Stage en entreprise <input type="checkbox"/>	Autre <input type="checkbox"/>
Option <input type="checkbox"/>	Stage à l'étranger <input type="checkbox"/>	
D. d'approfondissement <input checked="" type="checkbox"/>	Stage fin d'études <input checked="" type="checkbox"/>	
Date de remise :		
Contrat avec Forêt Services Nancy <input type="checkbox"/> OUI <input checked="" type="checkbox"/> NON		

### SUITE À DONNER (réservé au service des études)

- Consultable et diffusable
- Confidentiel de façon permanente
- Confidentiel jusqu'au / / , puis diffusable

## RESUME

Ce travail de mémoire de fin d'études d'ingénieur forestier a été réalisé au sein de l'unité mixte de recherche Interactions Arbres-Microorganismes (INRA Champenoux) sur la thématique de la structure génétique d'une population de truffes noires du Périgord, espèce très appréciée en gastronomie.

Les truffes sont des champignons ectomycorhiziens vivant en symbiose avec de nombreux arbres. Récemment, son génome a été entièrement séquencé et il a été démontré qu'elle présentait un mode de reproduction sexuée. L'objectif de cette étude est de cartographier la répartition des deux types de compatibilité sexuelle et des génotypes de *Tuber melanosporum* sur une plantation truffière située à Rollainville. Cette compréhension de la distribution des individus au sein de la truffière pourrait apporter des éléments majeurs pour favoriser la production de fructifications de truffe noire.

## SUMMARY

This report does a point on my six-months training period in the Research Unit Interactions between Trees and Microorganisms, about the problematic of genetics structure of a black truffles population, very appreciated species for gastronomy.

Truffles are ectomycorrhizal fungi, living in symbiosis with several forest trees. Few time ago, its whole genome has been sequenced and its sexual reproduction has been proved. The aim of this study is to map spatial distribution of *Tuber melanosporum* sexual types and genotypes on the Rollainville truffle orchard (Vosges). To understand spatial distribution of different individuals within the truffle field would permit to improve production of black truffle fruit bodies.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à exprimer ici toute ma gratitude à Francis Martin, Directeur de Recherche et chef de l'équipe d'écogénomique des interactions, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir donné sa confiance pour ce travail ;

A Christophe Robin, Directeur de Recherche et propriétaire de la truffière de Rollainville, pour nous avoir cédé l'accès au site expérimental ainsi que la belle récolte de truffe noire de cette saison qui a permis de mener à bien mon sujet de stage de fin d'étude.

Je souhaite aussi remercier très sincèrement François Le Tacon, Directeur de Recherche émérite, pour son aide lors de phase d'échantillonnage sur le terrain, pour ses conseils précieux et pour toutes les discussions enrichissantes autour de mes résultats.

J'adresse ma plus grande reconnaissance à Claude Murat, Ingénieur de Recherche, qui m'a encadrée en faisant preuve d'une patience et d'une disponibilité sans faille tout au long de mon stage.

Merci à Fabien Halkett pour ses conseils et ses éclairages sur les traitements de Bio-statistiques.

Enfin, je n'oublie pas d'adresser un grand merci à tous les membres de l'équipe pour leur accueil chaleureux et leurs interventions diverses pour le bon déroulement de mon stage.

## SOMMAIRE

<b><u>I. INTRODUCTION</u></b> .....	4
<b>1.1 La filière trufficole</b> .....	4
<b>1.1.1 Que sont les truffes ?</b> .....	4
<i>1.1.1.1 Les différentes espèces des truffes présentes en France</i> .....	4
<i>1.1.1.2 Ecologie de Tuber melanosporum</i> .....	6
<i>1.1.1.3 Tuber melanosporum, une espèce hétérothallique</i> .....	7
<b>1.1.2. La trufficulture</b> .....	10
<i>1.1.2.1 Historique de la trufficulture</i> .....	10
<i>1.1.2.2 Les truffières naturelles</i> .....	11
<i>1.1.2.3 Techniques de gestion des truffières</i> .....	11
<b>1.1.3 Etat de lieux de la filière trufficole</b> .....	12
<i>1.1.3.1 Organisation de la filière</i> .....	12
<i>1.1.3.2 Evolution de la production</i> .....	14
<i>1.1.3.3 La truffe comme outil de développement des territoires</i> .....	15
<i>1.1.3.4 Impacts économiques de la trufficulture</i> .....	16
<i>1.1.3.5 Législation</i> .....	16
<i>1.1.3.6 Points clés de questionnement des trufficulteurs et acteurs de la filière</i> .....	17
<b>1.1.4 Lien entre la filière truffe et la recherche</b> .....	18
<b>1.2. Structure génétique des populations</b> .....	18
<b>1.2.1 Définition</b> .....	18
<b>1.2.2 Généralités sur la structure des populations fongiques</b> .....	19
<b>1.2.3 Structure génétique chez les populations de truffes noires du Périgord</b> .....	20
<i>1.2.3.1 Répartition des individus de truffes noires à l'échelle européenne</i> .....	20
<i>1.2.3.2 Répartition des individus de truffes noires à l'échelle locale</i> .....	19
<b>1.2.4 Objectifs de l'étude</b> .....	23
<b><u>II. MATERIELS ET METHODES</u></b> .....	24
<b>2.1. Le site d'étude : la truffière de Rollainville</b> .....	24
<b>2.2. Echantillonnage</b> .....	24
<b>2.3. Extraction d'ADN</b> .....	25
<b>2.4. Protocole d'amplification PCR</b> .....	25
<b>2.4.1 Le locus des gènes de compatibilité sexuelle</b> .....	25
<b>2.4.2 Amplification des loci microsatellites</b> .....	27

<b>2.5. Méthodologie d'analyses statistiques et d'obtention des arbres phylogénétique.....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.1 Traitement statistique .....</b>	<b>28</b>
<b>2.5.2. Analyse de la structure génétique spatiale .....</b>	<b>28</b>
<b><u>III. RESULTATS</u> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Echantillonnage des truffes .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.1 Localisation des truffes de la saison 2011-2012 sur le site expérimental.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.2 Comparaison de la localisation des récoltes des deux saisons de production.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Analyse de la distribution des types de compatibilité sexuelle.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1 Mise au point d'amorces spécifiques à <i>Tuber melanosporum</i>.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2 Distribution des types de compatibilité sexuelle pour la saison 2011-2012.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.3 Comparaison avec la distribution des types de compatibilité sexuelle pour la saison précédente.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3. Analyse de la distribution des génotypes .....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1 Répartition des génotypes pour la saison 2011-2012.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.2 Mise en évidence d'un déplacement de génotypes entre les deux saisons.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Analyse de la structure génétique spatiale .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.1 Vérification statistique du nombre d'individus par génotypes.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2 Réalisation de corrélogrammes .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.3 Identification des sous-populations par Geneland.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5. Récapitulatif des résultats .....</b>	<b>40</b>
<b><u>IV. DISCUSSION</u> .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. La colonisation des racines par la truffe est-elle liée au type de compatibilité sexuelle ?.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. <i>Tuber melanosporum</i>, une espèce pionnière .....</b>	<b>42</b>
<b>4.3. Existe-t-il des flux de gènes au sein du dispositif de Rollainville ?.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. Que nous enseignent ces résultats pour le trufficulteur ?.....</b>	<b>43</b>
<b><u>CONCLUSION</u>.....</b>	<b>44</b>
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....</b>	<b>45</b>
<b><u>Liste des contacts</u>.....</b>	<b>48</b>

# I. INTRODUCTION

## 1.1. La filière trufficole

### 1.1.1 Que sont les truffes ?

Les truffes sont les fructifications hypogées d'organismes appartenant aux champignons. Ces structures de reproduction temporaires produisent les spores qui germeront pour disséminer l'espèce. Plusieurs milliers d'espèces fongiques appartenant aux Ascomycètes et aux Basidiomycètes forment des fructifications hypogées mais uniquement les espèces du genre *Tuber* appartenant aux Ascomycètes ont le droit au nom de « vraies truffes ». Dans ce document, je n'utiliserai le terme truffe que pour parler d'espèces appartenant à ce genre et vivant en symbiose avec certaines espèces ligneuses forestières par le biais des mycorhizes, organes symbiotiques qui résultent de l'association du mycélium et des tissus racinaires de la plante hôte.

#### 1.1.1.1 Les différentes espèces des truffes présentes en France

Le genre *Tuber* ne se rencontre que dans l'hémisphère nord entre 25° et 60° de latitude dans des climats très différents: tropicaux d'altitude, méditerranéens, tempérés ou tempérés froids, continentaux ou continentaux froids. Le développement des ascocarpes (fructifications) nécessite de bonnes conditions d'alimentation hydrique. Les truffes n'existent donc pas dans les climats arides, encore qu'il soit possible d'en trouver en Mongolie intérieure dans des conditions où la pluviosité annuelle est voisine de 350 mm. Plus de 100 espèces de *Tuber* ont été répertoriées dans le monde (Bonito et al., 2010) et 32 en Europe (Ceruti et al., 2003). En France la plupart de ces espèces sont présentes mais six espèces sont plus fréquentes (cf Figure 1.2).

La truffe blanche du Piémont, *Tuber magnatum*, a été récoltée pour la première fois en France au cours de la saison 2011/2012 dans le Sud Est (cf Figure 1.1).



Figure 1.1 : *Tuber magnatum*, la truffe blanche du Piémont (photo JC Savignac, 2011)

Dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à *Tuber melanosporum*, la truffe noire du Périgord, sur laquelle se concentrent de nombreuses recherches du fait de son intérêt gastronomique et économique.



La truffe noire du Périgord, *Tuber melanosporum*



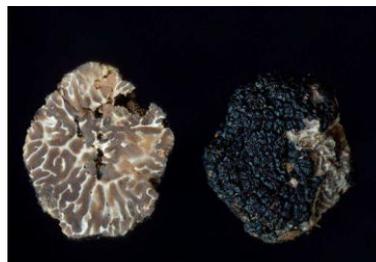
La truffe d'été ou truffe grise de Bourgogne, *Tuber aestivum*



La truffe jaune de Bourgogne, *Tuber excavatum*



La truffe mésentérique, *Tuber mesentericum*



La truffe musquée, *Tuber brumale*



La nez de chien, *Tuber rufum*

Figure 1.2 : Les principales espèces de truffes présentes en France (photo JC Savignac, 2011)

### 1.1.1.2 Ecologie de *Tuber melanosporum*

Cette espèce se trouve récoltée principalement en France, Espagne et Italie même si, depuis quelques années, elle a été introduite dans de nombreux pays. En France, les principales régions de récoltes sont le sud est et le sud ouest mais elle est aussi fréquente en Touraine et Bourgogne. Il est aussi possible de la récolter en Alsace et en Lorraine. Elle est inféodée aux sols calcaires, basiques ou neutres avec un pH entre 7 et 8, peu humifères, bien drainés et dont l'humus est le plus souvent de type Mull avec un C/N autour de 10. *Tuber melanosporum* se rencontre sur des substrats calcaires dotés d'une bonne réserve utile de type grès calcaire bien aérés pour les milieux acides ou calcaire crayeux peu profonds. Elle accepte aussi les cailloutis calcaires très filtrants. Pour toutes les espèces principales de truffes, la présence d'une fraction minimale de calcaire actif dans le sol est nécessaire ainsi qu'une matière organique bien décomposée et stabilisée (C/N autour de 10). Les sols légèrement acides doivent donc être carbonatés en surface, souvent par des apports anthropiques. Les sols à texture trop argileuse et peu drainants sont aussi à éviter pour la culture de la truffe noire. Ainsi, la nature de la roche mère et des sols est primordiale pour l'installation de la truffe dans un milieu, comme le montre ci-dessous, la carte de potentialité de culture de la truffe en fonction du substrat rocheux (Caillot, 1999 ; Diette et Lauriac 2004).

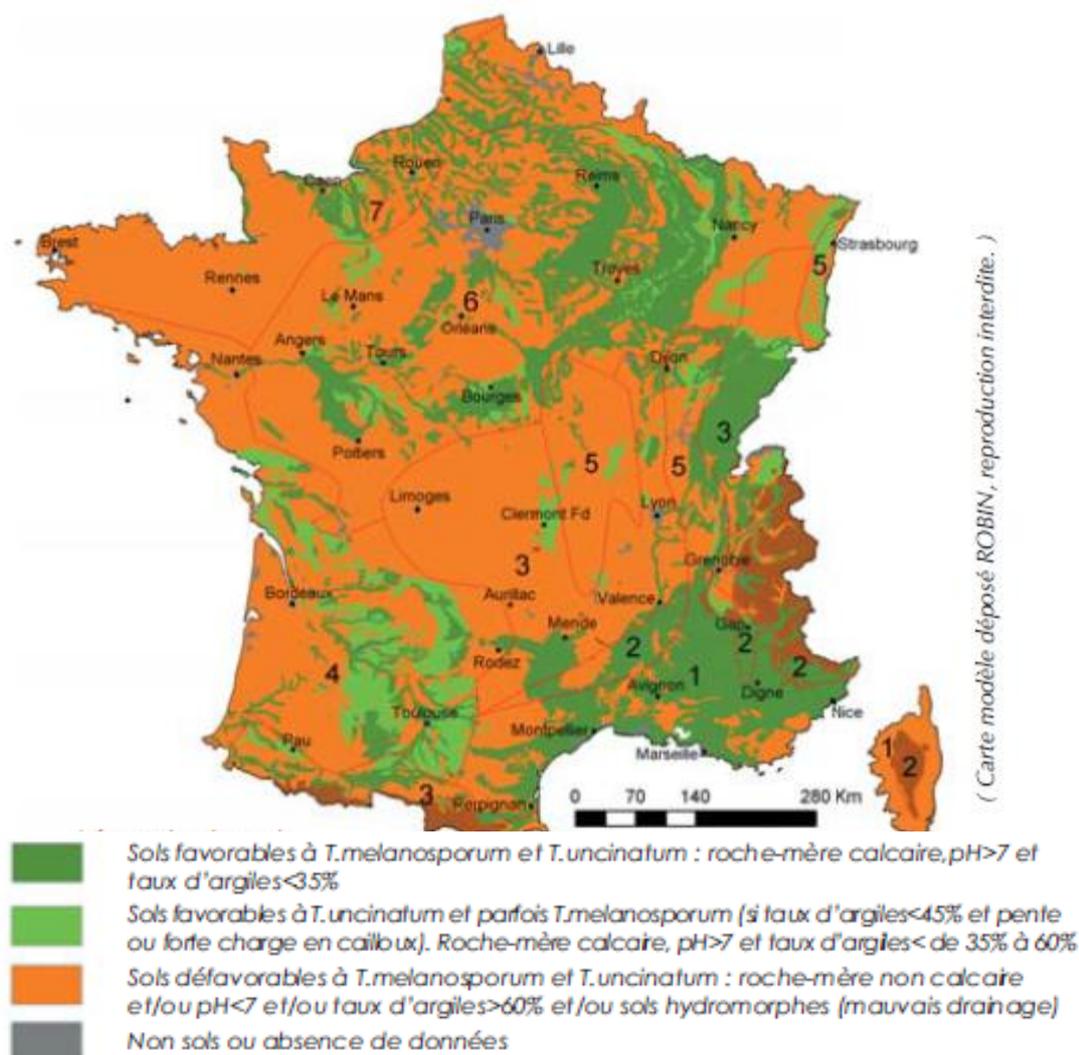


Figure 1.3 : Carte prédictive des potentialités trufficoles en France selon les caractéristiques géologiques et pédologiques (pépinières Robin)

*Tuber melanosporum* est présente jusqu'à 1000 m d'altitude et sur des terrains ensoleillés. Elle se plaît dans des vallées sèches bien exposées. Elle est associée traditionnellement aux chênes, plus particulièrement au Chêne pubescent et au Noisetier, mais elle peut être récoltée sous Charme, sous Tilleul, sous Bouleau ou sous certains résineux (genre *Pinus* ou *Cedrus*). La truffe noire se développe sous des climats tempérés ou méditerranéens, avec un ensoleillement de 190 à 290 jours par an, des températures estivales moyenne entre 16,5 et 22°C et des températures hivernales moyennes entre 2 et 8°C ; elle nécessite aussi un apport en eau régulier avec des précipitations moyennes de 600 à 1500 mm par an et est très sensible à la sécheresse, notamment estivale (Caillot, 1999).

*Tuber melanosporum* apprécie les milieux plutôt ouverts, aux stades de pré-bois, lorsque la fermeture du paysage est à ses commencements par la colonisation d'espèces ligneuses arbustives et arborées. C'est d'ailleurs suite à l'avancée de la forêt sur d'anciennes terres productrices de vignes, entièrement ravagées par le phylloxéra et de terres agricoles abandonnées par la forêt au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle que la trufficulture s'est considérablement développée dans le Sud de France. Dans les années 1860 à 1880, l'expansion de la trufficulture bénéficie des politiques de reboisement des terrains de montagnes, notamment sur le Ventoux et le Luberon qui deviennent les plus grandes truffières au monde (Diette et Lauriac, 2004).



Figure 1.4 : Pré-bois producteur dans l'Hérault (pépinières Robin)

### 1.1.1.3 *Tuber melanosporum*, une espèce hétérothallique

La découverte récente de l'existence d'une reproduction sexuée chez *Tuber melanosporum* suite à l'extraction de l'ADN des spores (Riccioni et al. 2008) a offert de nouvelles pistes d'étude alors que la truffe était considérée jusqu'alors comme une espèce autogame. Cette connaissance impose une vision différente de la formation de l'ascocarpe, nécessitant alors deux individus de sexes opposés et pose ainsi de nouvelles questions quant à l'existence de compétition entre les différents individus.

Les gènes de compatibilité sexuelle de *Tuber melanosporum* (Mating type) ont pu être isolés et identifiés suite au travail de séquençage du génome (cf § 2.3). Chez les Ascomycètes, ils contrôlent les processus de reproduction sexuée et présentent une structure plus ou moins similaire, un gène de contrôle qui se décline sous deux formes d'idiomorphes, MAT1-1 et MAT1-2. Ces deux types de compatibilité sexuelle opposés ne présentent pas la même structure : MAT1-1 est caractérisé par un domaine alpha box et MAT1-2 par un facteur de transcription HMG. C'est au niveau de ces domaines qu'ont été dessinées les premières amorces spécifiques Mating type, c'est-à-dire l'isolement de courtes séquences nucléotidiques propres à chacun des deux types de compatibilité sexuelle et permettant la caractérisation du sexe des individus par des méthodes de PCR<sup>1</sup>. (Rubini et al. 2010)

A l'aide de telles séquences spécifiques, il a été possible d'identifier le sexe des différents tissus de *Tuber melanosporum*. C'est ainsi que l'hétérothallisme de la truffe noire du Périgord a été prouvé en 2010. En effet, si l'ascocarpe et les mycorhizes d'un individu sont du même type de compatibilité sexuelle, les spores contenues dans les asques de la gléba présentent les deux types de compatibilité sexuelle en proportion équivalente. Les spores sont donc issues de la rencontre nécessaires de deux mycéliums de types de compatibilité sexuelle opposés.

La gléba en revanche est d'origine uniparentale, issue d'un mycélium haploïde<sup>2</sup>. La reproduction de *Tuber melanosporum* est bien de nature hétérothallique et non homothallique comme il a été longtemps suggéré (Murat, 2004), et nécessite la rencontre de mycéliums des deux types de compatibilité sexuelle. De plus, l'auto-compatibilité est impossible chez la truffe noire.

Le cycle biologique de *T. melanosporum* peut se décomposer en trois phases (Figure 1.5) :

<sup>1</sup> Réaction de polymérisation en chaîne

<sup>2</sup> C'est-à-dire ne présentant qu'un jeu de chromosomes, présents en un seul exemplaire chacun (cellules à n chromosomes)

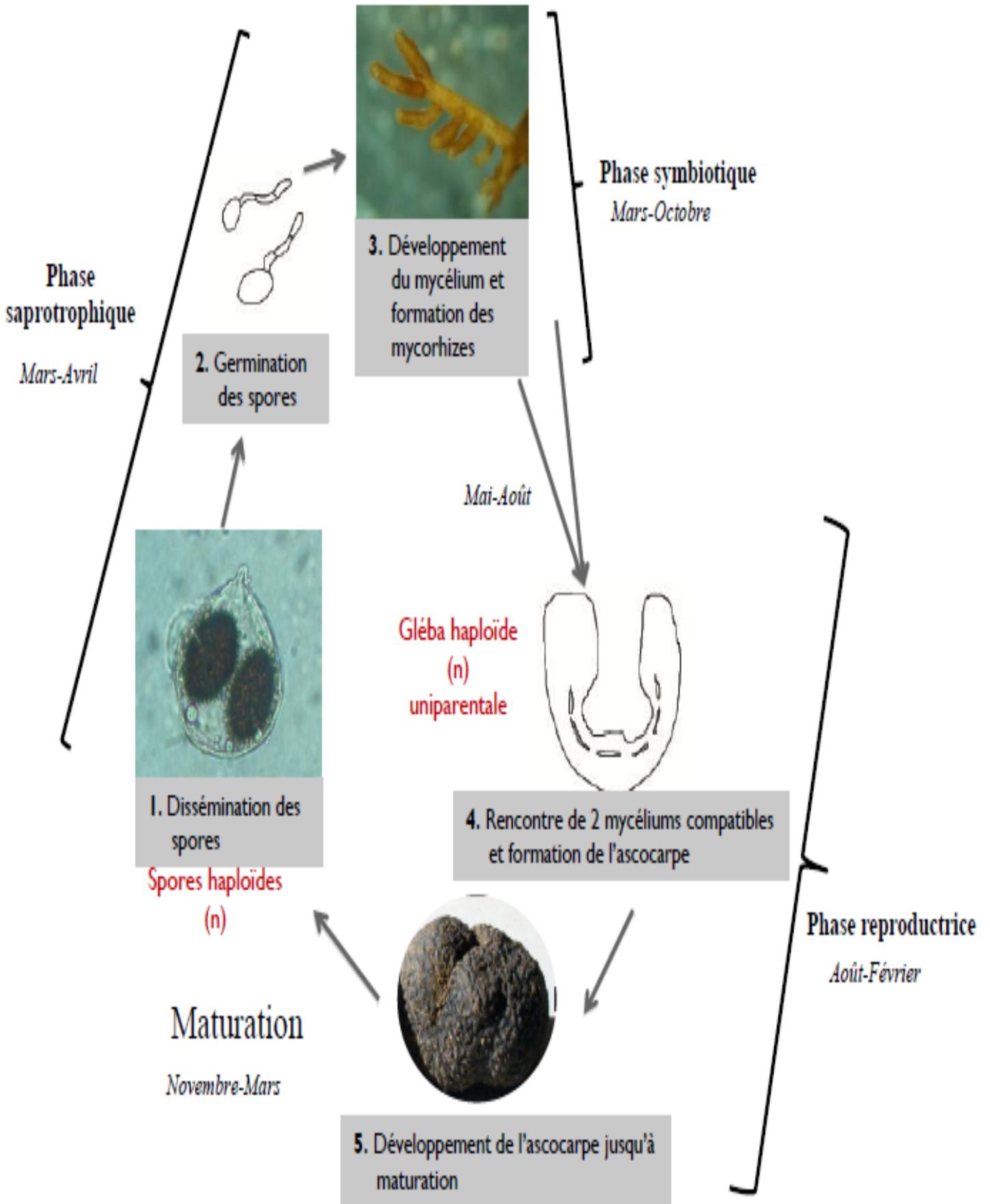


Figure 1.5 : Cycle biologique de la truffe (d'après Martin et al., modifié)

**1) La phase saprotrophique** : c'est l'étape de germination des spores et de développement des hyphes jusqu'à atteindre les racines. La propagation du mycélium est alors limitée par les conditions physico-chimiques, par les compétitions interspécifiques et par les incompatibilités somatiques entre individus de la même espèce. L'influence de la lumière est alors très importante au cours de cette phase.

**2) La phase symbiotique** : cette phase correspond à la symbiose entre le champignon et l'arbre hôte. La truffe est un champignon ectomycorhizien. Le mycélium forme alors un manteau autour des cellules végétales racinaires sans y pénétrer constituant un réseau d'hyphes, le réseau de Hartig. Cette association à bénéfice réciproque permet à la truffe, organisme hétérotrophe, de se procurer des sucres provenant de la photosynthèse de la plante. En contre partie, la truffe fournit à la plante l'eau et certains éléments minéraux comme l'Azote et le Phosphore. Cette symbiose mycorhizienne favorise la croissance de la plante et protège les racines face à certains pathogènes. La mycorhization des racines par le mycélium dépend d'un certain nombre de paramètres externes :

- pH, niveau trophique du milieu, niveau d'humidité et/ou d'irrigation
- Conditions climatiques
- Statut de l'arbre hôte et densité du couvert
- Compétition mycorhizienne liée à la présence d'autres espèces

**3) La phase reproductive** : au cours de cette étape, il y a formation d'un organe fructifère, l'ascocarpe, développé indépendamment des ectomycorhizes et du mycélium. Au sein de cette fructification, les spores sont contenues dans les asques. La truffe présente un système de reproduction sexuée et son hétérothallisme n'a été démontré que récemment. Sa reproduction nécessite donc la rencontre de deux mycéliums de compatibilité sexuelle opposée appelée mating type. Le grossissement de l'ascocarpe nécessite un apport d'eau important en été (pluies d'orage). La fructification arrive à maturité entre décembre et mars.

Le développement des mycéliums de *Tuber melanosporum* crée une zone de brûlé plus ou moins visible autour de l'arbre hôte, c'est-à-dire une zone clairsemée ou dépourvue de végétation pouvant atteindre quelques mètres de diamètre. Ce phénomène serait lié à un mécanisme d'allélopathie, se traduisant par l'émission de composés organiques phytotoxiques des mycéliums de truffe (volatile organic compounds, Streiblova et al. 2011). Ces derniers inhibent le développement de la végétation dans une stratégie de colonisation de l'espace et de compétition interspécifique (Bonfante et al. 1971). Plusieurs travaux de recherche sont menés afin de connaître les mécanismes de formation de ce brûlé.

## 1.1.2. La trufficulture

### 1.1.2.1 Historique de la trufficulture

Le terme de trufficulture désigne l'ensemble des étapes et techniques de culture des truffes. Dès l'Antiquité, les hommes connaissaient les qualités gastronomiques de ce champignon qu'ils cueillaient alors à l'état naturel dans les peuplements forestiers et les zones boisées.

Ce n'est qu'au XIX<sup>ème</sup> siècle que sont apparus les prémices de la culture truffière, tout d'abord uniquement sous forme empirique : vers 1810, Talon sème des glands de chênes producteurs de truffes et récolte ses premières truffes quelques années plus tard. Dans le courant des années 1820, la simple cueillette de la truffe se tourne progressivement vers une culture de production en sélectionnant et cultivant des glands de chênes producteurs (Caillot, 1999).

Dans les périodes 1860 et 1880, les lois de restauration de terrain de montagnes donnent lieu à d'importantes plantations, contribuant à l'installation et à l'expansion considérable de la truffe noire dans le Luberon et le Ventoux. La déprise agricole et l'abandon des terres viticoles après la crise du phylloxéra favorisent alors l'avancée de zones boisées et la constitution de pré-bois adéquats au développement des truffes. Apparaissent alors les premières techniques de cultures mettant en place des pratiques sylvicoles permettant d'associer production de truffe et sylviculture. C'est à cette époque que les récoltes de truffes sont les plus importantes en France. Durant la première moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, les pratiques évoluent vers un système plus agricole semblable à la culture de type verger, abandonnant les techniques de sylviculture truffière et d'ensemencement de glands issus de chênes truffiers. Mais au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, la trufficulture connaît le déclin dû à la déprise agricole et à la fermeture des paysages, la production de truffes s'essouffle et chute, divisée par 100 entre 1900 et 1950.

(cf. § 1.3.2)

Afin de relancer la production de truffes, l'INRA a lancé dans les années 1970 un programme de recherche visant à produire des plants associés à la truffe noire pour réaliser des plantations truffières. Les prémices se sont amorcés en 1967 avec la première obtention d'une symbiose mycorhizienne entre une truffe et un plant en pot (Palenzona, 1969). En 1972 les premiers lots de plants mycorhizés mis en vente sont une réussite et les premières truffes noires apparaissent quatre ans plus tard sous noisetier. Le noisetier, *Corylus avellana*, était apparu alors comme la meilleure essence truffière avant qu'on réalise qu'il s'associait avec de nombreuses espèces de champignons mycorhiziens. Actuellement, le choix se porte surtout sur les espèces de chênes, notamment sur le chêne vert et le chêne pubescent représentant respectivement 45% et 35% des arbres truffiers plantés en France. Le noisetier est ainsi légèrement délaissé du fait de ses plus grandes exigences en eau et de sa propension à s'associer avec d'autres espèces concurrentes comme *Tuber brumale* (Actes du colloque de Brive La Gaillarde, 2007).

Actuellement, plus de 250 000 plants mycorhizés avec des truffes sont vendus en France, ce qui représente une augmentation des plantations de 1000 ha par an. Cet effort de plantation a permis d'arrêter le déclin de la production qui maintenant s'est stabilisé et il semble même que la production augmente malgré des conditions climatiques non optimales.

En France 18 pépiniéristes produisent des plants à vocation truffière contrôlés et certifiés. Les deux pépiniéristes (pépinières Agritruffes et Robin) produisant des plants sous licence avec l'INRA couvrent plus de 80% du marché. Les 16 autres commercialisent des plants contrôlés par le CTIFL (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes).

### 1.1.2.2 Les truffières naturelles

Les truffières naturelles ou spontanées désignent des peuplements arborés produisant naturellement des truffes, sans avoir été inoculés auparavant. Anciennement seules sources fournisseuses de truffes, elles étaient entretenues par les activités de pastoralisme associées aux pratiques agricoles de l'époque. Pourtant, elles connaissent aujourd'hui un déclin important, dû tout d'abord à leur abandon au cours du XX<sup>ème</sup> siècle suite à la déprise agricole et à la fermeture des espaces cultivés.

De plus, ces truffières naturelles sont plus sensibles aux prédateurs (notamment le gros gibier comme les sangliers) ainsi qu'aux aléas climatiques, leur production étant plus incertaine que les truffières issues de plants mycorhizés artificiellement. Elles demeurent pourtant des zones de production à préserver notamment car elles constituent des écosystèmes particuliers avec une flore ligneuse et herbacée d'accompagnement spécifique. D'autre part, elles représentent un réservoir de diversité génétique pour les truffes.

	1970	1980	1990	2000
<b>Truffières naturelles</b>	80 000	60 000	40 000	35 000
<b>Plantations truffières</b>				
de plus de 30 ans	10 000	6 000	3 000	1 000
de 10 à 30 ans	2 000	2 000	4 000	5 000
de moins de 10 ans	2 000	3 000	4 000	4 000

Tableau 1.1 : Evolution des surfaces productrices de truffes en France (en hectares) (CGAEER, 2006)

Le tableau 1.1 met bien en évidence la diminution considérable de la part des truffières naturelles en quarante ans : environ 20 000 ha disparaissent tous les dix ans. De même, les anciennes plantations établies dans les années 70 ne sont pas maintenues alors que de nouvelles surfaces productrices sont mises en place chaque décennie.

### 1.1.2.3 Techniques de gestion des truffières

Les plantations truffières ont lieu en général au printemps ou bien en automne. La densité de plants mycorhizés est en général de 200 à 400 plants pour la truffe noire. Même artificialisée, la trufficulture reste une culture relativement pauvre en interventions humaines. Les deux paramètres d'intervention sont le sol et l'ouverture du couvert arboré.

#### Travaux en trufficulture traditionnelle :

Le travail du sol consiste à un griffage superficiel et un ratissage assez régulier. Le travail préalable à la plantation dépend de l'usage antérieur du sol. Ce griffage permet d'aérer le sol et d'éviter un éventuel tassement. Un broyage peut être entrepris pour limiter le couvert herbacé. L'apport en lumière est régulé par des tailles fréquentes des arbres, naturellement de faible hauteur, voire par des éclaircies des arbres peu ou pas producteurs. Les arbres inoculés commencent à produire généralement au bout d'une dizaine d'années mais il n'est pas rare d'avoir des arbres qui rentrent en production après seulement 4 ou 5 ans.



Figures 1.6 a et b : Plantations de noisetiers (Côte d'or) et de chênes (Vaucluse) mycorhizés par *Tuber melanosporum* (Photo G. Chevalier)

Le développement de l'ascocarpe nécessitant des apports réguliers en eau, l'irrigation des truffières se pratique de plus en plus pour faire face aux sécheresses printanières et estivales auxquelles les truffes sont particulièrement sensibles.

Même dans ces plantations truffières, l'anthropisation reste relativement faible, bien qu'on observe des différences de gestion selon les régions : aussi, les truffières du Midi sont souvent bien plus artificialisées, avec une gestion se rapprochant de l'arboriculture ou de l'agriculture : apports d'intrants, labours plus profonds (jusqu'à 10-15 cm de profondeur).

Il n'existe pas une technique universelle de trufficulture : les méthodes doivent s'adapter à l'essence truffière, aux conditions pédoclimatiques, aux régions, au niveau d'irrigation, etc. Les recherches se poursuivent dans le but d'améliorer les méthodes de tailles, d'éclaircies et de travail du sol.

#### Sylviculture truffière :

Il s'agit d'un mode de gestion sylvicole permettant la production conjointe de bois et de truffes. La sylviculture truffière est surtout réalisée pour la truffe du Bourgogne qui est une truffe de forêt alors que la truffe noire du Périgord est une truffe de milieu ouvert (cf § 1.1.2). Les truffes sont alors produites par un peuplement forestier, plus fermé qu'une truffière plantée, et sont valorisées en tant que produit forestier. L'entretien des arbres se traduit par des éclaircies et des coupes de type jardinatoire. Le traitement sylvicole peut alors s'apparenter à un traitement irrégulier (Diette et Lauriac, 2004). Deux types de coupes sont à effectuer : des coupes d'amélioration ayant pour but l'ouverture du couvert arboré. Les arbres prioritairement prélevés correspondent aux arbres peu producteurs, peu vigoureux ou au port trop élancé. Seront aussi menées des coupes de régénération et de recépage afin de redynamiser la production truffière de certains arbres.



*Figure 1.6 : Peuplements de pins sylvestres producteurs de truffes de Bourgogne (photo A. Lauriac)*

Cela peut apporter des revenus complémentaires importants à des propriétaires forestiers ayant des petites parcelles, bien souvent peu productives de bois de qualité et offre une opportunité non négligeable de valorisation de forêts pauvres comme la forêt méditerranéenne<sup>3</sup>.

Abandonnée pendant près d'un siècle et demi, la sylviculture truffière a été rénovée et remise sur le devant de la scène par le CRPF Languedoc-Roussillon afin de valoriser les forêts méditerranéennes peu productives en bois et de diversifier les produits issus de la forêt.

## **1.1.3 Etat des lieux de la filière trufficole**

### ***1.1.3.1 Organisation de la filière***

En 2006, dans son rapport sur l'état de la filière trufficole française, le Conseil Général de l'agriculture, de l'alimentation et des espaces ruraux estime le nombre de trufficulteurs en France à 15 000 et 20 000 planteurs et récoltants dont 2 500 présents sur les marchés avec 80% de la production.

<sup>3</sup> cf. Alcina : <http://www.alcina.fr>

La France compte 18 pépiniéristes producteurs de plants truffiers à raison d'une moyenne de 300 000 plants par an (étude FFT-FNDAT 2005).

La filière représente près de 1 000 emplois dont 550 équivalents temps pleins directs principalement en entretien des truffières et récoltes des productions, et presque autant d'emplois indirects, notamment dans les secteurs de l'agroalimentaire et de la restauration.

Les divers acteurs de la filière, depuis l'amont (production et plantation d'arbres truffiers) jusqu'à l'aval (valorisation des produits de la trufficulture) travaillent de concert au développement de cette activité. Différents acteurs de cette filière se sont regroupés en syndicats ou associations comme les producteurs de plants et les trufficulteurs<sup>4</sup>.

La Fédération Française de Trufficulture est organisée en 8 Fédérations départementales et 38 Fédérations régionales. Environ 50% des producteurs y sont adhérents. Elle regroupe les régions trufficoles, définit une politique professionnelle générale et assure la coordination entre les différentes structures, productrices, administratives ou scientifiques de la filière. La FFT agit au niveau de l'orientation des projets et de l'analyse des résultats obtenus en collaboration avec des organismes de recherche scientifique comme le CNRS, l'INRA ou le CEMAGREF. Elle travaille surtout à la reconnaissance de la filière par les autorités étatiques et à son organisation juridique par l'établissement d'un cadre fiscal et par l'appui de la production française en instaurant un système de contrôle et de traçabilité des produits par le biais de normes.

La FFT participe aussi au Groupement Européen Tuber (GET) fondé en 1999 et rassemblant les principaux pays producteurs de truffes en Europe, l'Espagne, l'Italie et la France.

Elle travaille aussi en accord avec le Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) et de l'Office national des vins, des fruits et légumes et de l'horticulture (VINILFHOR), maintenant FranceAgriMer, établissement public avec lequel elle a signé une convention.

### ***1.1.3.2 Evolution de la production***

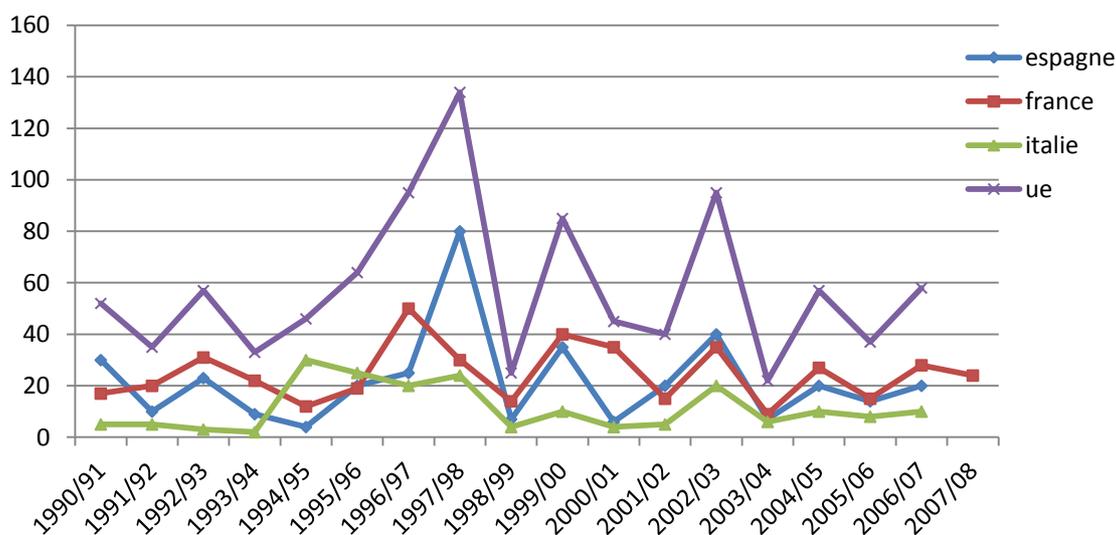
La production de truffes est en baisse considérable depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle: celle-ci est passée de 1 000 à 2 000 tonnes par an vers 1900 à quelques dizaines de tonnes par an dans le courant du XX<sup>ème</sup> siècle. Pour la saison 2011-2012, la récolte s'est élevée à 52 tonnes. Ceci est à relier directement avec la surface productrice, nettement inférieure aujourd'hui qu'elle ne l'était. On estime qu'en 40 ans ce sont 8 500 ha qui ont été plantés en France mais cela ne permet pas de recouvrir la production du XIX<sup>ème</sup> siècle assurée à l'époque par 60 000 ha producteurs. Notons que 80% de la production de *Tuber melanosporum* provient de plantations truffières et non pas de truffières naturelles.

On peut considérer néanmoins que la truffe noire du Périgord est hors de danger de disparition en France, puisque depuis quelques années la production s'est stabilisée et il semble même qu'elle soit en progression. La comparaison avec les récoltes du siècle dernier est alors à prendre avec précaution, puisqu'il faudrait connaître la répartition entre les différentes espèces ; il est d'ailleurs fort probable que les 1000 tonnes annuelles concernaient l'ensemble des espèces confondues.

<sup>4</sup> Syndicat National des Pépiniéristes produisant des Plants à Vocation Truffière :

<http://pepinieristes-truffiers.com/default/page/index/idmnuement/19/>

Fédération Française de Trufficulture : <http://www.fft-tuber.org>



Graphique 1.1 : Evolution de la production de truffe noire en Europe depuis 20 ans en tonnes/année (d'après Savignac, 2011 ; source : BMR, GETT)

### 1.1.3.3 La truffe comme outil de développement des territoires

Par sa forte empreinte patrimoniale, et plus particulièrement gastronomique, la culture de la truffe s'inscrit aussi dans une logique de développement de territoires le plus souvent ruraux et à l'agriculture extensive. Comme il a été vu plus précédemment (§ 1.3.1), la filière trufficole soutient quelques centaines d'emplois et participe à la vie économique des régions productrices, tout d'abord par le biais des marchés de gros de truffes noires dans le Sud de la France. Richerenches (Vaucluse), Carpentras (Vaucluse), Valréas (Drôme), Aups (Var), et Lalbenque (Lot) représentent les principaux marchés de truffes noires fraîches et attirent chaque année de nombreux professionnels de la filière agroalimentaire et de la restauration entre décembre et mars, activités non négligeables pour la vie des communes d'accueil de ces marchés. Il existe de nombreux autres marchés commercialisant la truffe noire au détail dans le Sud-Ouest et le Sud-Est ainsi que dans le Centre-Est où se vendent les espèces de truffes plus septentrionales.<sup>5</sup>

Suivant les régions et les départements des subventions à l'investissement et à l'entretien des truffières peuvent être accordées aux producteurs dans le cadre de soutien financier à la production fruitière et à l'aménagement des territoires. En Lorraine par exemple, il s'agit de subvention à la diversification agricole. En 2009, le conseil Régional donnait une subvention de 20% des dépenses pour l'investissement sur matériels de production neufs pour un investissement minimum de 3000 € HT. Les Conseils généraux peuvent aussi aider à l'investissement : la Meuse versait jusqu'en 2009 une aide départementale de 15% pour les investissements matériels en productions fruitières, maraîchères ou viticoles alors que la Meurthe-Et-Moselle n'accordait pas de subvention à l'époque (Robinet, 2009).

La truffe occupe aussi une place dans le tourisme de ces régions, se tournant de plus en plus vers un tourisme gastronomique des terroirs ou vers l'agrotourisme, comme le témoigne la multiplication des « Maisons de la Truffe » et des « fêtes de la truffe » dans les régions productrices. Dans son étude de l'impact socio-économique de la trufficulture de 2005, la FFT estime entre 5 000 et 7 000 le nombre de personnes attirées par les fêtes de la truffe dans des villes comme Lalbenque ou Saint-Paul Trois Châteaux, et jusqu'à 10 000 visiteurs pour celle d'Uzès.

<sup>5</sup> site FFT : <http://www.fft-tuber.org>

### 1.1.3.4 Impacts économiques de la trufficulture

En tant que produit de luxe, la truffe et sa culture ont des répercussions économiques conséquentes pour la filière et pour les régions productrices. Le prix de la truffe noire varie entre 700 et 800 €/kg, et peut augmenter jusqu'à plusieurs milliers d'euros le kilo après des saisons plus difficiles (sécheresse, gel). Sur la base des cinq dernières années de production, la valeur de l'ensemble des truffes récoltées en France est estimée à 24 000 000 €. Les activités amont (fournisseurs de matériel, recherche, formations...) et aval (marchés, transformation, tourisme truffier...) génèrent aussi d'importants apports économiques. Pour l'année 2010, l'impact économique global de la trufficulture française a été évalué à 82 000 000 €. (Savignac, 2011).

Effets économiques "amont"		Effets économiques "aval"	
Fournisseurs divers matériels	3 000 000 €	Marchés & commercialisation	2 000 000 €
Techniciens et formateurs	1 500 000 €	Transformations	24 000 000 €
Recherche/Expérimentations	1 000 000 €	Agrotourisme truffier	200 000 €
		Tourisme truffier	2 500 000 €
Autres	800 000 €	Autres	500 000 €
<b>Total</b>	<b>6 300 000 €</b>	<b>Total</b>	<b>29 200 000 €</b>

Tableau 1.2 : Effets économiques amont et aval de la trufficulture en France

Si l'Europe du sud (France, Italie et Espagne) constitue le berceau de la production où la truffe est naturellement présente, elle est désormais cultivée dans de nombreux pays comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande ou les Etats-Unis par le biais de plants inoculés (G.Chevalier, 2007). Le marché des truffes s'est donc mondialisé. La production de truffes dans l'hémisphère sud ouvre principalement la période creuse de récolte en Europe (entre février et Août). Ceci permet alors un approvisionnement continu au cours de l'année des marchés internationaux. L'Europe demeure tout de même le foyer principal de production et de consommation de la truffe noire du Périgord, d'où part la plus grosse proportion des exportations vers l'Amérique de Nord et l'Asie. La production de truffe reste insuffisante pour répondre à la demande mondiale.

<http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/marie/web/ntic/pages/2008/idier.html#%C3%A9tiquette1>

### 1.1.3.5 Législation

La loi encadre à la fois la récolte des truffes, réglementant, entre autre, les périodes et les quantités de récolte pour chaque espèce, mais aussi leur commercialisation pour faire face aux fraudes.

Les modalités de récolte en milieu naturel sont fixées par arrêté préfectoral qui établit les périodes de récolte, les méthodes autorisées et les précautions à prendre suivant les réglementations locales. De la même façon, c'est un arrêté préfectoral qui réglemente la vente de truffes fraîches.

En 1996, le comité interprofessionnel INTERFEL définit une norme « truffe fraîche » afin d'améliorer la qualité et la traçabilité des truffes produites en France. Cette norme stipule les caractéristiques de qualité, de poids et de marquage des truffes à respecter pour la vente sous l'appellation « truffe fraîche ». Elle précise aussi les dates de vente des différentes espèces, calquées sur les périodes de maturité (la vente de truffes immatures étant considérée illégale).

Espèces	Dates de maturité
<i>Tuber melanosporum</i> Vitt. ou <i>Tuber nigrum</i> Bull.	15 novembre au 31 mars
<i>Tuber brumale</i> Vitt. et <i>Tuber brumale</i> Vitt. var. <i>moschatum</i> Ferry de Bellone	15 novembre au 31 mars
<i>Tuber aestivum</i> Vitt.	1 <sup>er</sup> mai au 30 septembre
<i>Tuber uncinatum</i> Chatin	15 septembre au 15 janvier
<i>Tuber mesentericum</i> Vitt.	15 septembre au 15 janvier
<i>Tuber borchii</i> Vitt. ou <i>Tuber albidum</i> Pico	15 janvier au 30 avril
<i>Tuber macrosporum</i> Vitt.	1 <sup>er</sup> septembre au 31 décembre

Tableau 1.3 : Dates de commercialisation autorisée pour les espèces de truffes récoltées en France (Vignaud, 2006)

L'élaboration de cette norme vise à améliorer la visibilité du consommateur quant à la qualité et la provenance des truffes commercialisées et des produits à base de truffes (produits truffés). Cet accord interprofessionnel est complété par un arrêté interministériel.

Le 30 janvier 2012 s'est ajoutée une norme concernant les produits truffés qui réglementent les conditions de l'appellation « truffés » en fonction de la pureté et de la composition des espèces de truffes utilisées. Cette norme impose aux fabricants de préciser le nom des truffes utilisées pour les produit « truffés », « au jus de truffe » ou « aromatisés au jus de truffe ». La mention « truffé » est réservée aux aliments contenant les espèces : *Tuber melanosporum*, *Tuber brumale* et *Tuber magnatum*. Les appellations « au jus de truffe » ou « aromatisés au jus de truffe » sont attribuées uniquement aux produits alimentaires contenant les espèces *Tuber melanosporum* et *Tuber brumale*. Le pourcentage de truffe doit être indiqué à la commercialisation et supérieur à 1%. (Le Trufficulteur n°78\_ 2012)

#### 1.1.3.6 Points clés de questionnement des trufficulteurs et acteurs de la filière

Les trufficulteurs, et plus généralement les divers acteurs de la filière trufficole s'interrogent sur plusieurs points primordiaux pour la production de truffe. Il s'agit pour eux d'améliorer les conditions de production et les rendements de leurs truffières (améliorer la mycorhization des plants truffiers), ainsi que de faire face aux contraintes rencontrées en trufficulture, dues aux conditions climatiques (sécheresse), à la compétition d'autres espèces de champignons (importation d'espèces concurrentes). Voici quelques exemples de ces question clés :

- ✓ Comment gérer les aléas climatiques (gelées précoces et tardives, sécheresse) dans le contexte des changements globaux ?
- ✓ Comment améliorer la qualité des plants inoculés et les modalités de plantation ?
- ✓ Chercher à développer des techniques de culture et de sylviculture truffière
- ✓ Amorcer une restauration des truffières naturelles en net déclin
- ✓ Approfondir les connaissances de naissance et développement des truffes ainsi que les questions relatives à leur nutrition (transfert de nutriments entre le sol, les mycorhizes, les truffes et les plantes hôtes)
- ✓ Quels sont les rôles joués par les plantes accompagnatrices ou compétitrices sur les truffières ?
- ✓ Développer des outils moléculaires pour étudier le cycle biologique *in situ* et identifier au niveau moléculaire les différentes espèces de truffes afin d'éviter les fraudes et tromperies sur les produits commercialisés

## 1.1.4 Lien entre la filière truffe et la recherche

Du fait des multiples intérêts économiques, écologiques et culturels de la trufficulture, la recherche tente de comprendre la biologie et l'écologie de ce champignon depuis plusieurs dizaines d'années. En 2005, la FFT a estimé que le coût de la recherche en trufficulture s'élevait à 400 000€ (étude d'impact FFT-FNDAT, 2005). Les professionnels de la culture de la truffe posent un certain nombre d'interrogations auxquelles les chercheurs essaient d'apporter des réponses.

Le but principal était d'abord d'étudier le processus de mycorhization des racines du plant hôte par la truffe, qui a conduit à l'élaboration par l'INRA de protocoles d'inoculation artificielle de plants truffiers à partir des années 70. Plus récemment, ce sont les mécanismes de reproduction de la truffe noire qui ont fait l'objet de nombreuses recherches et publications, notamment en France et en Italie. C'est ainsi qu'a été démontrée dans les années 2000 la reproduction sexuée de la truffe noire du Périgord et la mise en évidence des gènes de compatibilité sexuelle (cf § 1.1.3).

En 2010, un projet de recherche financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre de l'appel d'offre SYSTERRA s'appelant SYSTRUF<sup>6</sup> rassemble plusieurs unités de recherche et collaborateurs de la filière trufficole (CNRS, INRA, FFT, CETEF, Université de Montpellier). Ce projet de recherche aborde de nombreux thèmes pluridisciplinaires afin de mieux connaître le fonctionnement des truffes et des écosystèmes truffiers :

- étude de la formation et de la nature du brûlé,
- analyse de l'écosystème truffier (végétation et communautés microbiennes et fongiques accompagnatrices),
- connaissance des mécanismes de la reproduction sexuée de la truffe noire,
- suivi du transfert de carbone et d'azote au sein du continuum sol – mycorhize - ascocarpes - arbre truffier,
- recherche des composés responsables des qualités organoleptiques.

Le travail effectué dans le cadre de mon stage de mémoire porte sur l'une des tâches du projet SYSTRUF visant à caractériser la diversité génétique de *T. melanosporum* sous deux arbres producteurs. Dans le chapitre suivant, nous aborderons l'intérêt d'étudier la diversité génétique d'une espèce.

## 1.2. Structure génétique des populations

### 1.2.1 Définition

Une population est un ensemble d'individus de la même espèce qui interagissent au moment de la reproduction. Elle représente une communauté constituée par l'ensemble des génotypes des individus qui y appartiennent. Une population est donc caractérisée par un patrimoine génétique correspondant à la somme de tous les génotypes des individus pour chaque gène.

La structure génétique d'une population correspond à la répartition des caractères génétiques partagés entre les différents individus d'une même espèce au sein de l'espace qu'ils occupent. Il s'agit alors d'analyser la distribution des allèles (diverses versions d'un même gène) entre les individus par le biais de marqueurs moléculaires afin d'en dégager des informations sur la diversité des individus génétiquement différents, appelés génotypes, et sur leur répartition spatiale au sein de leur environnement *in situ*.

<sup>6</sup> Bases d'une gestion écologique durable, des écosystèmes truffiers producteurs de *Tuber melanosporum*

L'analyse de la diversité génétique et de la structure des populations fait appel à l'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques divers tels que les séquences microsatellites ou SSR (Short Sequences Repeat) utilisées pour les travaux de génotypage. Il s'agit de courtes séquences de 2 à 6 nucléotides répétées, réparties régulièrement dans le génome et présentant un fort polymorphisme (c'est-à-dire l'existence de plusieurs allèles pour un locus). Ainsi, ces loci de SSR ont des taux de mutations bien plus élevés que les autres domaines du génome : le taux de mutations peut atteindre une fréquence de  $10^{-4}$  à  $10^{-3}$  par locus contre  $10^{-8}$  pour des substitutions simples dans le génome humain (Weber and Wong, 1993).

Le génome de *Tuber melanosporum*, avec plus de 20 000 SSR est très riche en séquences microsatellites, pour la plupart situées dans les régions intergéniques du génome (Murat et al. 2011).

A partir de ces différents allèles trouvés pour chaque microsatellite, on peut identifier des génotypes par combinaison des allèles des différents SSR.

Cette analyse apporte des éléments de connaissance sur le brassage génétique, les flux de gènes entre individus, et explique donc les stratégies de colonisation de l'espace, directement corrélées avec les adaptations génétiques et les modes de dispersion de l'espèce.

### 1.2.2 Généralités sur la structure des populations fongiques

Du fait de la très grande diversité existant chez les Champignons, les dynamiques de population présentent de problématiques différentes suivant la nature saprophytique parasitique ou symbiotique des champignons étudiés. Dans les deux derniers cas, leur capacité de dispersion dépend de la présence et de la nature de leur hôte, notamment dans le cas des hôtes végétaux. De façon générale, les champignons disposent de deux moyens principaux de dispersion dans l'espace : le mycélium et les spores.

Le développement et la croissance du mycélium, constitué de nombreux filaments (hyphes), conduisent à une propagation locale de l'individu. Ce mode de dispersion est fréquent chez les champignons et mène à la formation de génotypes de grandes tailles allant jusqu'à plusieurs dizaines de  $m^2$ . Le deuxième mode de dispersion correspond à la production de spores issues de la méiose. Les spores sont contenues dans la fructification du champignon, appelée carpophore. Les spores relâchées dans le milieu alentour sont alors transportées par zoochorie ou anémochorie sur des distances plus ou moins importantes, facilitant la colonisation d'espaces et le brassage génétique (Carriconde, 2008).

La migration des individus et leur capacité d'installation dépend aussi de la stratégie de colonisation propre à l'espèce. L'étude des communautés fongiques a permis de dégager quatre stratégies principales rencontrées chez les champignons.

Les espèces de stratégie S regroupent des espèces tolérantes au stress et plus généralement, adaptées à des milieux à forte contrainte qu'ils vont coloniser, s'affranchissant ainsi des problématiques de concurrence interspécifique face aux ressources. A l'inverse, les espèces de stratégie C ont développé une stratégie compétitrice fortement centrée sur la colonisation rapide du milieu notamment par le biais de la reproduction végétative.

Les espèces de stratégie R se caractérisent par un cycle de vie de courte durée et une utilisation des ressources énergétiques concentrées sur la reproduction, en particulier sur la production de spores sexuées. Chez les champignons, elles correspondent à des espèces présentant de nombreux génotypes différents, de petite taille, fugaces et très dispersés, issus du brassage de la reproduction sexuée. Ce sont alors de nouveaux individus génétiques qui apparaissent chaque année. Ces espèces sont de type pionnières, capables de coloniser de nouveaux milieux.

Les espèces de stratégie K au contraire font part d'une longue durée de vie et utilisent principalement leur énergie à la croissance et à la propagation de leur mycélium.

Elles développent des mycéliums pérennes. Leurs populations présentent une faible diversité génétique avec peu de génotypes largement répartis sur leur aire de présence et survivant d'une année sur l'autre, propres aux espèces post-pionnières (Douhan et al. 2011).

### 1.2.3 Structure génétique chez les populations de truffes noires du Périgord

Du fait de sa valeur symbolique, culturelle et patrimoniale, la truffe intéresse depuis longtemps les scientifiques. En particulier, les mécanismes de formation de l'ascocarpe, partie fructifère comestible du champignon, ont poussé les chercheurs à se pencher sur les questions de reproduction de la truffe, afin de faciliter et favoriser la production trufficole en déclin.

La connaissance de *Tuber melanosporum* a été considérablement approfondie ces dernières années grâce au développement des techniques de pointe en génétique et en biologie moléculaire. En 2005, débute le séquençage complet du génome de *Tuber melanosporum* qui est publié en 2010. Ce séquençage a été coordonné par l'UMR Interactions Arbres Microorganismes. Ce génome se révèle être l'un des plus gros génomes de champignon séquencés à ce jour, comprenant 125 millions de paires de bases et en revanche, un petit répertoire de gènes (7500 gènes) (Martin et al. 2010), contre 65 millions de paires de bases pour *Laccaria bicolor*, autre champignon mycorhizien dont le génome est séquencé (Martin et al. 2008). Cette avancée primordiale a permis d'accéder à de nouvelles études comme celles de différents gènes de la truffe, dont les gènes de compatibilité sexuelle de *Tuber melanosporum*. (cf §1.1.3)

Pendant plusieurs années, la truffe noire était considérée comme génétiquement homogène, avec une diversité génétique pauvre (Bertault et al. 2001 ; Murat et al. 2004). Cette idée a été remise en cause avec l'identification d'un polymorphisme notable chez plusieurs individus de provenances diverses grâce à des marqueurs microsatellites (Murat et al. 2011, Riccioni et al. 2008).

#### 1.2.3.1 Répartition des individus de truffes noires à l'échelle européenne

L'utilisation de marqueurs moléculaires spécifiques a permis de comprendre entre autre les processus de migration de *Tuber melanosporum* en Europe méditerranéenne après la dernière glaciation (Murat et al. 2004 ; Riccioni et al. 2008). Du fait de ses exigences écologiques, la truffe noire n'a pas de continuité de ses habitats et présente donc des populations fragmentées dans le Nord de l'Espagne, de l'Italie (Piémont) et en France. La faible diversité génétique de *Tuber melanosporum* serait liée au rétrécissement des populations lors de la dernière ère glaciaire, qui expliquait leur faible polymorphisme. L'identification des trois haplotypes ancestraux dans la région du Piémont pose l'hypothèse d'une origine italienne de *Tuber melanosporum* qui aurait ensuite migré par la vallée du Po puis traversé la chaîne des Alpes. Ces haplotypes se sont alors distribués en Espagne et dans le Sud de la France, suivant les mêmes voies de migration postglaciaire que *Quercus pubescens*, un des hôtes privilégiés de la truffe noire. Ceci explique que l'on retrouve trois haplotypes principaux à travers les grandes régions européennes de présence de *Tuber melanosporum*. Les points de divergence des voies de migration constituent des puits de forte diversité génétique, de même que les massifs de montagnes (Alpes, Pyrénées, Massif central) forment des barrières conduisant à l'isolation de certains génotypes. Les zones de refuge des génotypes de truffe correspondent aux points de refuge et d'installation des différents haplotypes de chêne pubescent (Murat, 2004).

En revanche, comme vu précédemment, l'identification d'un fort polymorphisme au sein de populations de *Tuber melanosporum* remet en question l'idée de sa pauvreté en diversité génétique.

### 1.2.3.2 Répartition des individus de truffes noires à l'échelle locale

La compréhension de la production de truffes passe aussi par l'étude de leur dynamique de populations à une échelle plus restreinte. En effet, qu'en est-il des flux de gènes et d'individus au niveau d'une truffière ?

Une des clés pour comprendre la reproduction de la truffe est de connaître la répartition des deux types de compatibilité sexuelle au sein de la truffière. Il a été observé qu'un arbre hôte était exclusivement associé à un seul type de compatibilité sexuelle au niveau des ascocarpes et des mycorhizes. En revanche, si les truffes récoltées sous un même arbre sont toutes du même type de compatibilité sexuelle, elles peuvent être de génotypes différents. Il semble donc que paradoxalement, les types de compatibilité sexuelle opposés restent éloignés d'une certaine distance d'un arbre à l'autre. Pourtant, la production d'ascocarpes nécessite une association de deux mycéliums opposés. La caractérisation du type de compatibilité sexuelle a aussi été effectuée au niveau de l'ADN présent dans le sol de la truffière. On retrouve alors les deux types de compatibilité sexuelle sur l'ensemble de la zone productrice, résultat concordant avec l'hétérothallisme de *Tuber melanosporum* (Rubini et al. 2011).

On peut supposer qu'il y a compétition d'un type de compatibilité sexuelle sur l'opposé autour d'un arbre qui expliquerait la présence d'individus génétiquement différents mais de type sexuel identique. Ceci impliquerait l'existence d'un système de répulsion du type de compatibilité sexuelle opposé autour d'un arbre hôte. Les mêmes observations seraient faites au niveau de plants récemment inoculés par *Tuber melanosporum* : si les deux types de compatibilité sexuelle sont présents au moment de l'inoculation, entre 6 mois et 1 an après inoculation, il semblerait qu'un seul des deux types ne soit présent au niveau des racines du plant (Murat et al. 2010).

On obtient bien les mêmes résultats sur la truffière de Rollainville pour les saisons 2010 et 2011 comme le montre les résultats des travaux de Herminia de la Varga sur 17 ascocarpes récoltés sous les noisetiers F10 et F11 de la truffière expérimentale de Rollainville (88) entre octobre 2010 et février 2011.

- *Distribution des types de compatibilité sexuelle*

L'identification par les amorces mating type a été menée sur les ascocarpes récoltés, les mycorhizes associées et le sol des carrés contigus. L'étude des génotypes avait été effectuée uniquement sur les truffes et les mycorhizes.

Les résultats montraient bien une distribution des types de compatibilité sexuelle, un type étant affecté à un seul arbre, cette distribution étant identique pour les ascocarpes et pour les mycorhizes :

- Ascocarpes : MAT1-1 autour de F11 et MAT1-2 autour de F10
- Mycorhizes : même répartition que pour les ascocarpes
- Sol : même distribution spatiale pour MAT1-1 mais MAT1-2 est aussi présent autour de F11

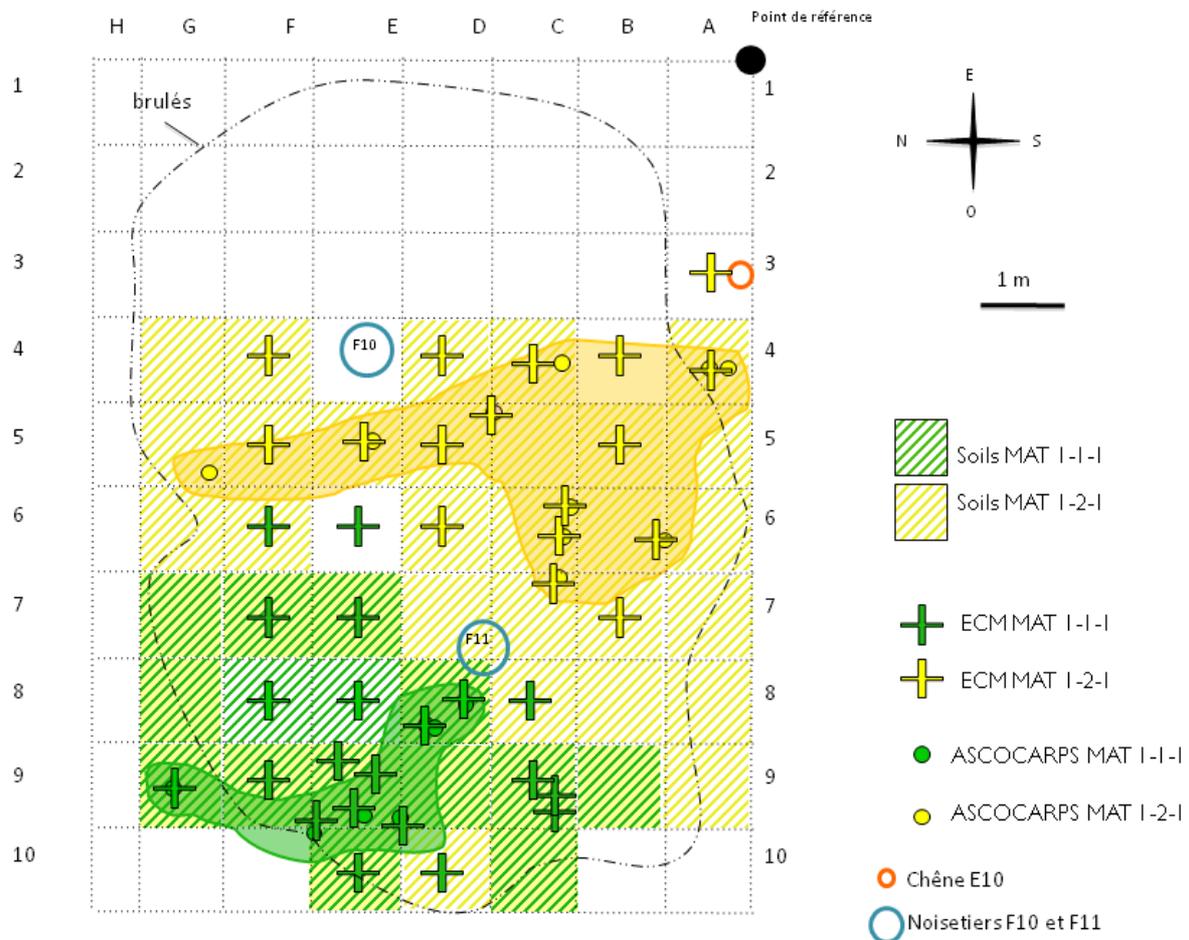


Figure 1.7 : Distribution spatiale des types de compatibilité sexuelle des ascocarpes, des mycorhizes et du sol autour de F10 et F11 pour la saison 2010-2011 (De La Varga, 2011, en cours)

Hypothèses :

- Le MAT1-1 est absent du sol dans la zone de F10, ceci étant illogique puisque des fructifications ont été récoltées.
  - Le MAT1-1 est présent mais en très faible quantité.
  - Le seuil de détection de MAT1-1 est inférieur à celui du MAT1-2.
  - La capacité de migration du MAT1-2 est plus importante.
- *Distribution des génotypes*

L'analyse de génotypage a nécessité l'utilisation de 10 séquences microsatellites (dont 2 non polymorphes) : 5 génotypes avaient été identifiés autour de F10 et 2 génotypes autour de F11 au niveau des ascocarpes. Notons que les deux génotypes en A4 sont certainement associés au chêne E10, probablement associé aussi au MAT 1-2. En revanche, tous étaient du même type de compatibilité sexuelle autour de chaque arbre (MAT1-2 en F10 et MAT1-1 en F11) pour les ascocarpes et les mycorhizes. On trouve tout de même 3 génotypes de mycorhizes qui ne correspondent à aucun génotype des ascocarpes. En général, on ne trouve qu'un seul génotype par racine.

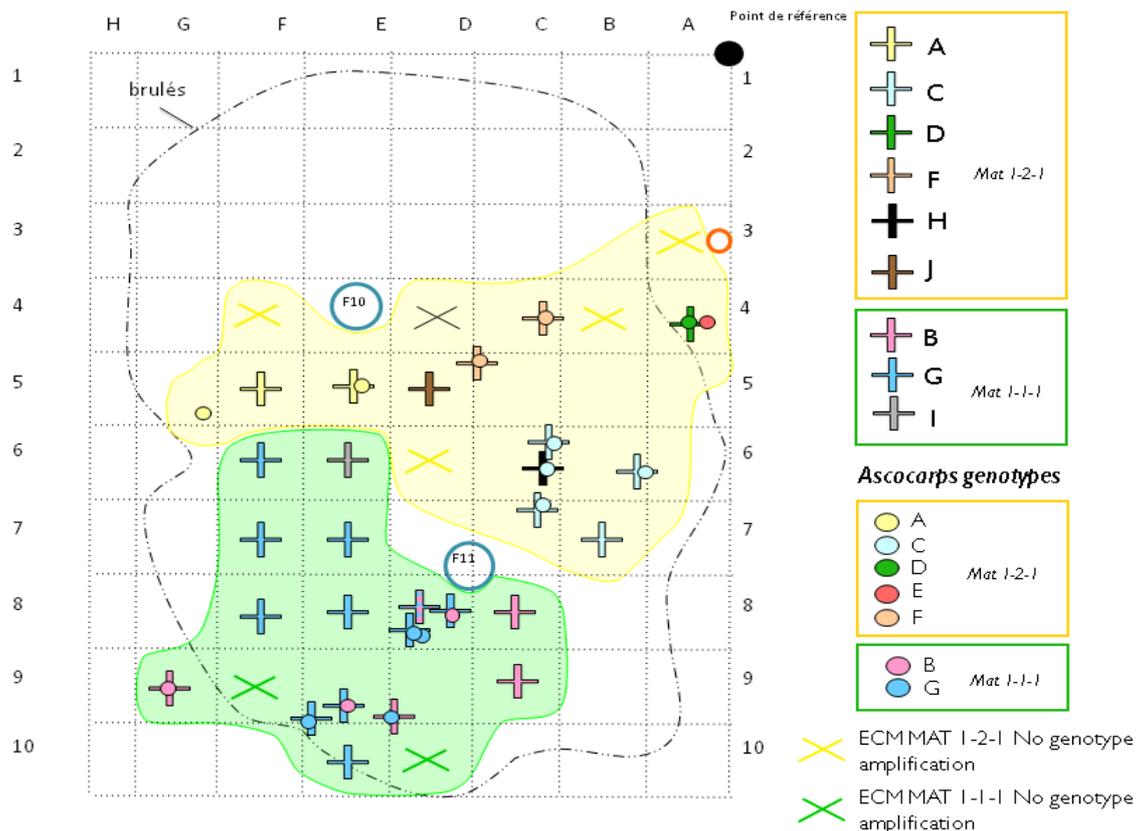


Figure 1.8 : Distribution spatiale des génotypes des truffes et des mycorhizes autour de F10 et F11 pour la saison 2010-2011 (De La Varga, 2011, en cours)

A l'issue de cette étude se posent quelques interrogations majeures auxquelles le travail réalisé dans ce mémoire tentera d'apporter des réponses.

### 1.2.4 Objectifs de l'étude

Le but de ce travail est d'analyser la structure génétique de la population de truffe noire du Périgord sur l'ensemble d'une plantation truffière puis d'en établir une cartographie précise. Cette étude s'est échelonnée sur deux niveaux, qui mettent en application deux types de marqueurs moléculaires: le locus des gènes de compatibilité sexuelle et des marqueurs microsatellites.

La connaissance des modalités de reproduction et de colonisation de l'espace (notamment quant à la dispersion des individus portant l'un ou l'autre des deux gènes de compatibilité sexuelle à l'échelle d'une truffière) pourrait apporter des éléments majeurs pour favoriser la production de fructifications de truffe noire.

Les analyses réalisées au cours de ce travail ont été effectuées à partir des truffes récoltées sur le site de Rollainville. La truffière de Rollainville fait l'objet des diverses expérimentations depuis plusieurs années, notamment dans le cadre du projet SYSTRUF :

- Analyses des flux de C et N afin de déterminer le transfert des nutriments des racines de l'arbre aux truffes et aux mycorhizes
- Etude de la capacité des truffes à dégrader la matière organique et la litière (azote marquée 15N)
- Suivi de la distribution des types de compatibilité sexuelle et des génotypes des truffes, des mycorhizes et du sol depuis deux ans. C'est sur ce thème que s'articule mon travail de mémoire.

Cette étude consiste donc à poursuivre ce suivi de la répartition des individus de truffes noires sur la truffière de Rollainville et de comparer leur distribution entre les saisons 2010-2011 et 2011-2012. Ce travail fait appel à des méthodes de génotypage en utilisant des amorces spécifiques des gènes de compatibilité sexuelle et microsatellites pour le génotypage.

L'analyse conjointe des résultats obtenus à la saison dernière par une précédente étude et de mes résultats de cette année permettra d'approfondir la connaissance du comportement des populations de *Tuber melanosporum* ainsi que leur mode de reproduction, et de répondre à quelques interrogations :

- Les fructifications des deux saisons sont-elles aux mêmes endroits?
- La distribution en « taches » des types de compatibilité sexuelle des tissus maternels des fructifications est-elle la même d'une saison à l'autre ?
- Est-ce que ce sont les mêmes génotypes au niveau des tissus maternels des fructifications d'une saison à l'autre ?
- Y a-t-il un déplacement des génotypes ?
- Y a-t-il des liens de parenté entre les différents génotypes d'une même saison et des deux saisons consécutives ?

## **II. MATERIELS ET METHODES**

### **2.1. Le site d'étude : la truffière de Rollainville**

Cette plantation truffière se situe dans le département des Vosges, au Nord-Est de Neufchâteau sur le plateau calcaire à proximité d'une pelouse sèche calcaire. Elle est située à 360 m d'altitude. Le climat a une tendance semi-continentale et une pluviométrie importante (température annuelle moyenne de 9,5°C et pluviométrie moyenne de 941 mm). Elle repose sur un sol à texture argileuse, de type calcarisol brun, très basique (pH proche de 7,97) et riche en calcaire. Plantée en 1991 avec des noisetiers et des chênes sessiles inoculés par *Tuber melanosporum* et *Tuber aestivum* (Naudet Pépinières), la truffière a commencé à produire en 2005 des truffes noires et en 2006 des truffes d'été.

Ce site présente quelques particularités comme sa très bonne productivité, la localisation en surface des truffes et des racines mycorhizées, l'absence de contamination par d'autres espèces et sa situation en aire limite de répartition de *Tuber melanosporum*. Ces particularités en font un site idéal pour une optique de truffière expérimentale.

### **2.2. Echantillonnage**

Le matériel biologique étudié provient de la truffière expérimentale de Rollainville pour les deux saisons, et plus particulièrement de deux noisetiers producteurs à l'Est de la truffière, F10 et F11 (Figure 2.1). Ces deux arbres, les plus productifs de la truffière, ont la particularité de partager la même zone de brûlé contrairement aux autres arbres producteurs qui présentent chacun une zone brûlée bien distincte à son pied. Le brûlé de F10 et F11 est quadrillé par un maillage de 1 m x 1 m affecté de coordonnées permettant une précision de prélèvement à 5 cm près.

Les fructifications ont été récoltées via l'aide d'un chien truffier.

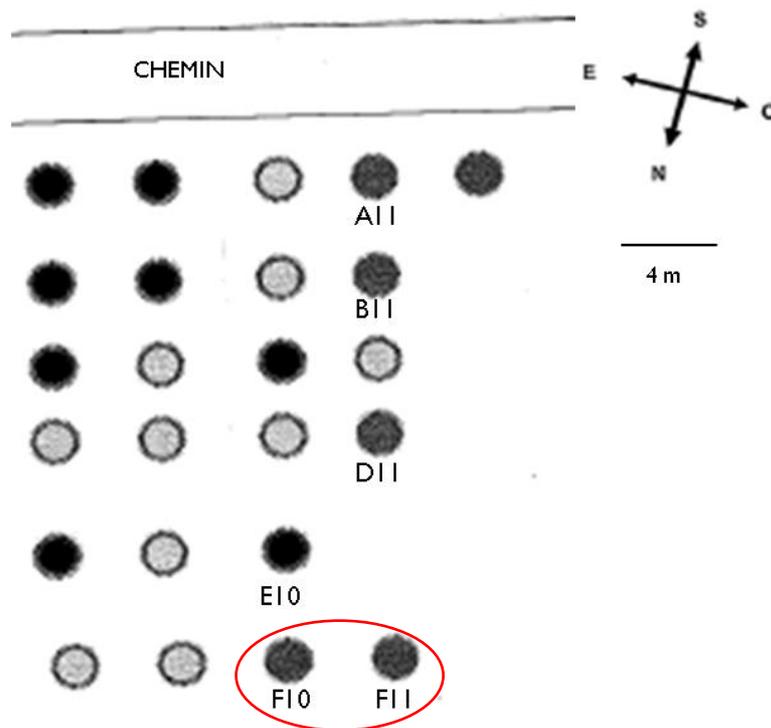


Figure 2.1 : Plan du site expérimental de Rollainville (d'après Le Tacon)

Afin d'avoir plus d'échantillons que l'année précédente et d'avoir un aperçu des flux d'allèles sur l'ensemble du site, des truffes ont été récoltées sous trois autres arbres de la truffière (A11, B11 et D11) et ont fait l'objet des mêmes analyses de type sexuel et de génotypage.

### 2.3. Extraction d'ADN

Les ADN sont extraits des ascocarpes à partir du kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) après conservation de quelques minutes dans l'azote liquide et broyage manuel de 100 mg de gléba. La phase d'élution nécessite deux fois 100  $\mu$ L de tampon d'élution. Les ADN sont ensuite conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4. Protocole d'amplification PCR

#### 2.4.1 Le locus des gènes de compatibilité sexuelle

Les ADN extraits sont ensuite amplifiés avec des amorces spécifiques selon le principe de la PCR (« polymérase chain réaction »). L'amplification s'effectue à l'aide d'une enzyme polymérase (Taq polymérase) qui va permettre la fixation des amorces spécifiques et l'amplification des séquences d'ADN qu'elles ont ciblées.

Pour l'amplification PCR du locus de compatibilité sexuelle, il s'est avéré que les couples d'amorces mis au point par Rubini et *al.* 2011 n'étaient pas spécifiques à l'espèce *Tuber melanosporum* et amplifiaient d'autres espèces proches. Deux nouveaux couples d'amorces ont donc été dessinés dans le gène HMG pour l'idiomorphe MAT 1-2 et à l'extérieur du gène Alpha-box pour l'idiomorphe MAT 1-1 (Figure 2.2). Ces amorces sont appelées :

MAT 1-1 FOR2 (5'-ctgatcgacattcggagat-3') et MAT 1-1 REV (5'-tccagccagcaactatcct-3') (203pb)

MAT 1-2 FOR (5'-ctctatccacaatcatcc-3') et MAT 1-2 REV (5'-gagacgcaagaacggtttcc-3') (151pb)

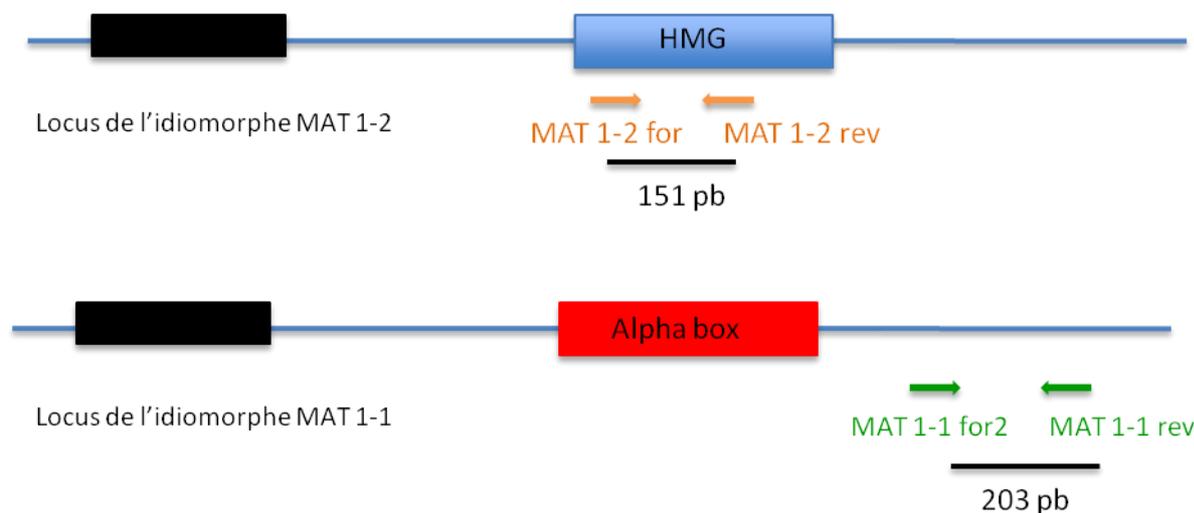


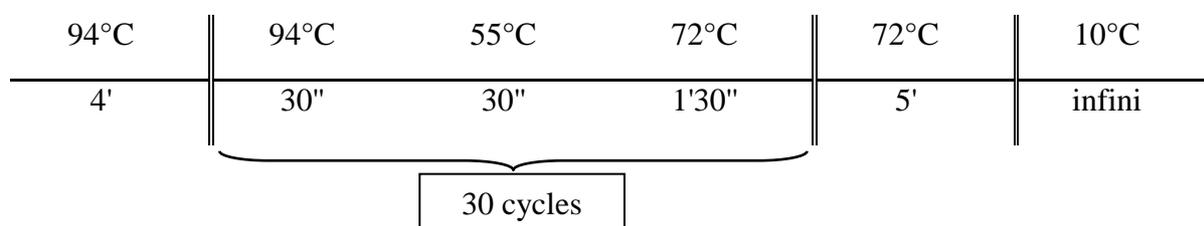
Figure 2.2 : Représentation schématique des amorces spécifiques définies au niveau des gènes MAT 1-1 et MAT 1-2

L'amplification PCR a été préparée avec un mix de base de 19  $\mu\text{L}$  pour des échantillons PCR de 20  $\mu\text{L}$  puisqu'on rajoute 1  $\mu\text{L}$  de l'ADN à analyser. Les proportions de chacun des composants sont les suivantes, en  $\mu\text{L}$  :

- Buffer (10x) = 2
- BSA (16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) = 0,7
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) = 1,5
- dNTP (2,5 mM) = 1
- Taq polymérase (5U/ $\mu\text{L}$ ) = 0,2
- Pour chaque amorce (10  $\mu\text{M}$ ) = 0,40
- H<sub>2</sub>O quantité suffisante pour 19  $\mu\text{L}$

Pour éviter les contaminations ou erreurs de manipulation, on a préparé un prémix pour 100 réactions. Pour les identifications par les amorces spécifiques mating type, on a travaillé en multiplex (les deux couples d'amorces sont présents dans le mix dès le départ de la réaction). Pour améliorer le rendement des PCR, on ajoute aussi de la BSA (Bovine Serum Albumine) à raison de 0,7  $\mu\text{L}$  pour 19  $\mu\text{L}$  de mix.

On lance ensuite le thermocycleur avec le cycle suivant sur 30 cycles avec une durée d'élongation à 72°C de 1 min 30s.



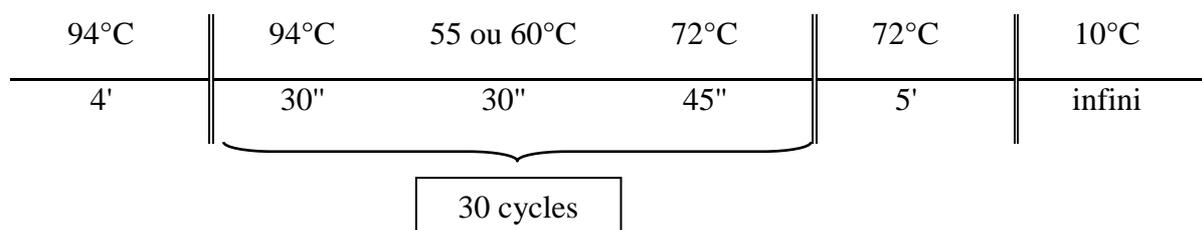
Les produits PCR ont été visualisés sur un gel à 2% d'agarose dilué dans 80 mL d'un tampon TBE (Tris-Borate EDTA). 5  $\mu\text{L}$  de produit PCR sont chargés avec 1  $\mu\text{L}$  de bleu de charge. La migration dure entre 20 et 30 min à 111 V. Puis le gel est plongé 10 à 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant de l'ADN, avant d'être rincé dans l'eau. Il est finalement révélé par un scanner GELDOC à rayons ultra-violets.

## 2.4.2 Amplification des loci microsatellites

La réaction de PCR a été effectuée dans un volume de 10  $\mu\text{L}$ . Les proportions de chacun des composants sont les suivantes, en  $\mu\text{L}$  :

Buffer (10x) = 1  
 $\text{MgCl}_2$  (25 mM) = 1,5  
 dNTP (2,5 mM) = 1  
 BSA (16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) = 0.3  
 Taq polymérase (5U/ $\mu\text{L}$ ) = 0,2  
 Pour chaque amorces (10  $\mu\text{M}$ ) = 0,10  
 H<sub>2</sub>O quantité suffisante pour 10  $\mu\text{L}$

Les cycles sont identiques mais la durée d'élongation est raccourcie à 45" à 30 cycles.



La température d'hybridation est choisie en fonction de la température optimale des amorces utilisées ; dans notre cas, elle était de 55 ou de 60 °C suivant les amorces. Neuf marqueurs microsatellites ont été utilisés, parmi ceux mis au point par Murat et *al.* 2011 :

Marqueurs microsatellites	T optimale	Rang
Tm16_ATA12	55°	169-178 pb
Tm241_TAA17	55°	250-259 pb
Tm2_TAT15	55°	144-231 pb
Tm98_TAT15	55°	204-255 pb
Tm112_TAT19	60°	248-323 pb
Tm9_ATCA12	55°	302-354 pb
Tm1_ATTG18	60°	304-372 pb
Tm75_GAAA14	55°	315-355 pb
Tm22_CCTCAT17	55°	312-354 pb
Tm269_TGTTGC15	55°	338-398 pb

Chaque amorce est associée à un fluorochrome : D2 (noir), D3 (vert) ou D4 (bleu).

Une fois les amplifications effectuées, la taille des produits PCR est analysée sur le séquenceur CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter). En effet, le polymorphisme des SSR s'évalue par la taille des produits PCR qui est proportionnelle au nombre de répétitions du motif. L'appareil utilisé est un séquenceur à 8 capillaires de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre (Beckman Coulter CEQ TM 8000 Fullerton, CA) relié à un ordinateur à partir duquel se font les commandes. Dans une plaque de 96 puits, 1  $\mu\text{L}$  de chaque produit PCR marqué est ajoutée à 20 $\mu\text{L}$  de formamide désionisé (solution SLS) et 0,1  $\mu\text{L}$  de marqueur de poids moléculaire. Cette plaque est installée dans le séquenceur, ainsi que le tampon de séparation, utilisé pour linéariser et dénaturer l'ADN en simple brin afin de faciliter sa migration. Les fragments sont séparés et lus par l'automate en fonction de leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrilamide puis détectés par colorimétrie grâce à la présence du fluorochrome. Par calibration avec le marqueur de taille, la position du signal de fluorescence sur le gel de migration permet de connaître la taille du fragment amplifié.

Les profils de génotypage issus du séquenceur ont été corrigés un par un manuellement pour identifier les différents allèles. Un tableau Excel a ainsi été généré pour chaque ascocarpe. Ce tableau a permis l'identification des différents génotypes par analyse des combinaisons d'allèles pour les 9 marqueurs pour les échantillons récoltés en 2011-2012 ainsi qu'une comparaison avec le tableau généré l'année dernière sur la récolte 2010-2011. Les génotypes ont ensuite été placés sur les cartes afin d'avoir une cartographie fine de la structure génétique des truffes sur le site de Rollainville.

## 2.5. Méthodologie d'analyses statistiques

### 2.5.1 Identification des génotypes multilocus

La première question posée à propos de l'analyse d'une structure génétique au sein de la truffière de Rollainville a été de déterminer précisément le nombre d'échantillon à prendre en considération. En effet, les marqueurs moléculaires nous ont permis d'identifier plusieurs génotypes différents parfois partagés par plusieurs tissus maternels d'ascocarpes récoltés indépendamment. Il faut donc décider à l'aide de traitement statistique s'il est plus judicieux de travailler sur l'ensemble des échantillons ou sur l'ensemble des différents génotypes, considérant les individus de même génotype comme clones. Ces analyses ont été réalisées à partir du logiciel MLGSIM 2.0<sup>7</sup> (Stenberg et al. 2003). Le nombre de répétitions a été fixé à 1000.

[http://www.rug.nl/fmns-research/theobio/downloads/manual\\_MLGsim2.0.pdf](http://www.rug.nl/fmns-research/theobio/downloads/manual_MLGsim2.0.pdf).

### 2.5.2. Analyse de la structure génétique spatiale

Pour cette analyse, uniquement les génotypes identifiés grâce aux marqueurs microsatellites ont été considérés. Pour les génotypes ayant plusieurs échantillons, la coordonnée centrale du génotype a été considérée. La structure génétique spatiale est évaluée dans un premier temps, la réalisation de corrélogrammes entre l'apparement estimé et la distance spatiale en utilisant le logiciel SPAGEDI. Pour cela le coefficient de parenté (Kinship coefficient ; Loiselle et al., 1995) a été calculé pour 10 intervalles de distance géographique. Ceci a été réalisé avec tous les génotypes des deux saisons de récoltes, des génotypes retrouvés uniquement lors de la saison 2011-2012 et des génotypes retrouvés sous F10/F11 d'une saison comparée à l'autre saison. Afin d'évaluer la structure génétique spatiale, l'indice  $S_p$  a été calculé selon la formule de Vekemans and Hardy 2004 :  $S_p = -b/(1 - F1)$

$b$  étant la valeur de « slope » (pente) de l'analyse de régression linéaire réalisée avec 10000 permutations des coefficients de parentés pour toutes les paires de génotypes sur la distance logarithmique entre les génotypes et F1, la moyenne du coefficient de parenté pour le premier intervalle de distance.

Si  $S_p$  n'est pas différent de 0 cela signifie que la distribution des génotypes n'est pas différente de la distribution aléatoire des génotypes indiquant une absence de structure génétique spatiale. Par contre si  $S_p$  est différent de 0 alors une structure génétique spatiale est détectée.

L'existence de sous-populations dans la truffière a été testée par le logiciel Geneland (Guillot et al. 2005) développé pour détecter la structure des populations à partir d'individus géoréférencés et géotypés. Pour cette analyse, uniquement les génotypes trouvés en 2011 et

<sup>7</sup> Multilocus Genotypes Simulations

2012 ont été utilisés. Deux analyses indépendantes ont été réalisées : la première en n'utilisant que les marqueurs moléculaires neutres microsatellites et la deuxième en ajoutant le locus MAT qui est soumis à sélection. Pour l'analyse, les paramètres par défaut ont été utilisés à l'exception de:

npopmin : 1  
 npopmax : 10  
 nit : 550000  
 thinning : 100  
 freq.model : Uncorrelated  
 varnpop : TRUE  
 spatial : TRUE

L'étape de post-processing a été réalisée avec 550 répétitions. Afin de trouver le nombre de sous-populations, 10 analyses indépendantes ont été réalisées.

## III. RESULTATS

### 3.1. Echantillonnage des truffes

#### 3.1.1 Localisation des truffes de la saison 2011-2012 sur le site expérimental

Cette saison a été légèrement plus productive que la précédente puisque la récolte s'est élevée à 44 truffes sur l'ensemble des cinq arbres échantillonnés cette année.

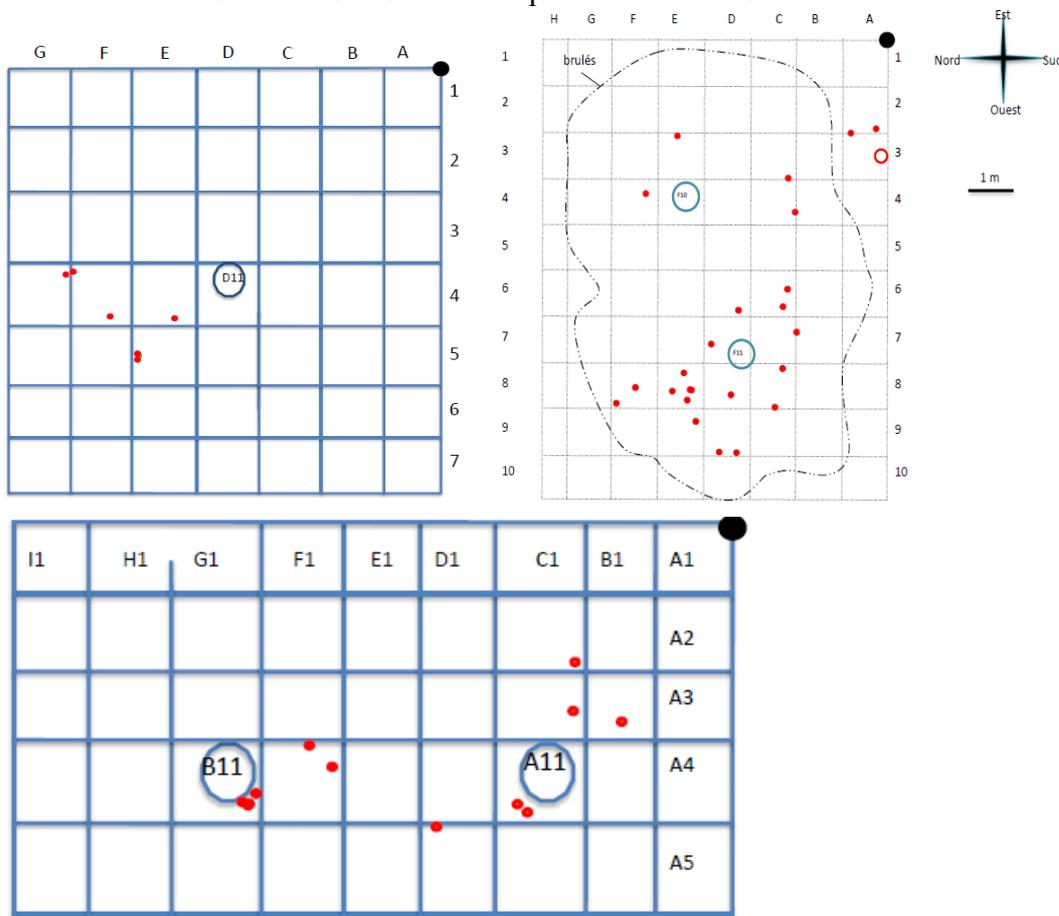


Figure 3.1 : Localisation des ascocarpes échantillonnés à la saison 2011-2012

### 3.1.2 Comparaison de la localisation des récoltes des deux saisons de production

Concernant la comparaison des récoltes 2010-2011 et 2011-2012 sous les arbres F10 et F11, les ascocarpes, pour la plupart, ne se retrouvent pas dans les mêmes carrés indiquant un déplacement de la production d'une année à l'autre (Figure 3.2).

La récolte de la saison 2011-2012 est un peu plus importante que la précédente avec 25 truffes récoltées tardivement, entre mi-janvier et fin février alors que 17 ascocarpes avaient été récoltés à l'automne 2010. Notons que 18 truffes sur les 25 récoltées en 2011-2012 proviennent de carrés qui étaient non producteurs en 2010 ; sur 12 carrés producteurs en 2011-2012, 7 ne l'étaient pas en 2010-2011, et 3 ascocarpes ont été récoltés en limite de carrés non producteurs en 2010, s'éloignant ainsi des zones de production de l'an dernier.

Arbres	Saison 2010-2011		Saison 2011-2012	
	Nombre de truffes	Poids (g)	Nombre de truffes	Poids (g)
F10/F11	17	263	25	719
A11	–	–	6	184
B11	–	–	6	62
D11	–	–	7	305
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>263</b>	<b>44</b>	<b>1270</b>

Tableau 3.1 : Comparaison des récoltes des deux saison consécutives

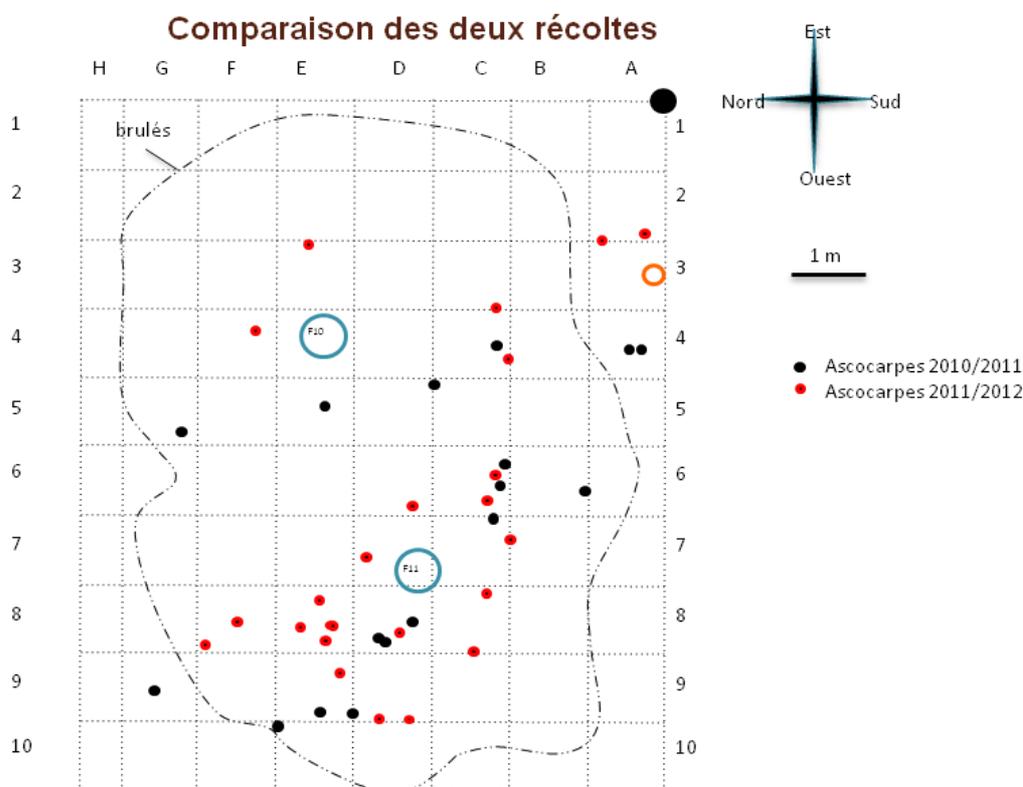


Figure 3.2 : Superposition des récoltes de truffes de récoltes de 2010 et 2011 autour de F10 et F11

Cette rotation des zones productrices d'ascocarpes entre les saisons semble liée à une stratégie de colonisation de l'espace dans une logique de préservation ou de recherche des ressources nutritives, facteur limitant pour la formation de la fructification.

## 3.2. Analyse de la distribution des types de compatibilité sexuelle

### 3.2.1 Mise au point d'amorces spécifiques à *Tuber melanosporum*

Tous les ADN ont été extraits avec succès. L'identification des gènes de compatibilité sexuelle des truffes a été effectuée avec deux couples d'amorces dessinés au cours de cette étude. Afin de vérifier que ces amorces sont bien spécifiques à *T. melanosporum* elles ont été testées sur deux espèces de truffes proches phylogénétiquement à *T. melanosporum* : *T. brumale* et *T. indicum*. Comme l'indique le gel présenté en figure 3.3, un signal n'a été obtenu que pour les ADN correspondant à *T. melanosporum*.

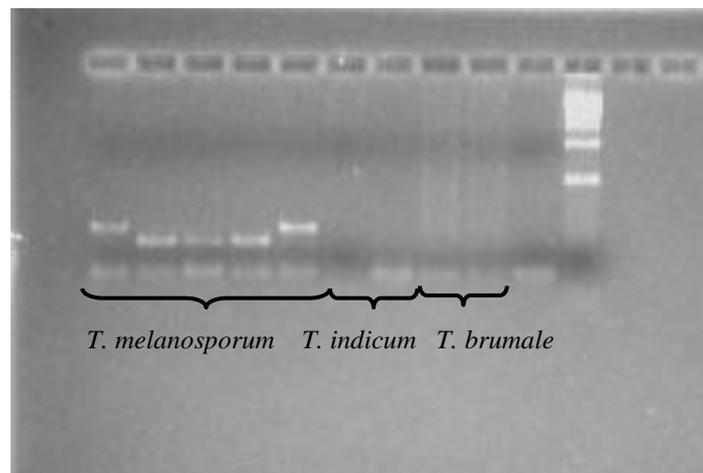


Figure 3.3 : Résultat d'une PCR multiplex testant la spécificité à *Tuber melanosporum* des couples d'amorces dessinés

Ces amorces ont été ensuite utilisées pour caractériser le gène de compatibilité sexuelle des tissus maternels de toutes les truffes récoltées.

### 3.2.2 Distribution des types de compatibilité sexuelle pour la saison 2011-2012

Tous les ADN des ascocarpes de la récolte ont été amplifiés avec les amorces spécifiques pour les loci de compatibilité sexuelle ; les résultats sont observés sur gel d'agarose. Le dernier puits correspond à un contrôle négatif, c'est-à-dire pour lequel on n'a pas ajouté d'ADN aux réactifs afin de vérifier leur absence de contamination.

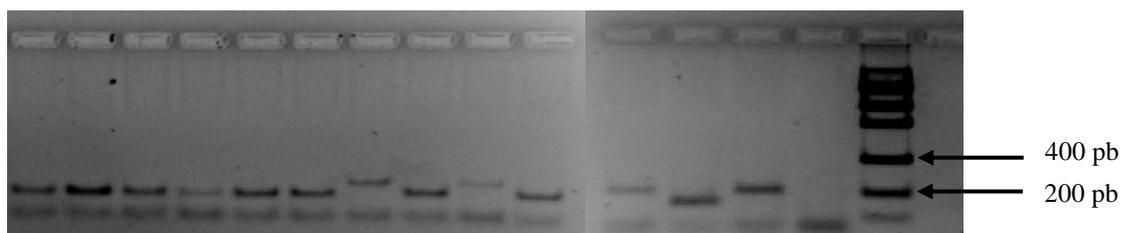


Figure 3.4: Résultat d'une PCR avec les amorces MAT1-1 FOR2/MAT1-1 REV et MAT 1-2 FOR/MAT1-2 REV en multiplex

Sur les 44 truffes, 20 ont un signal pour le MAT1-1 et 24 pour le MAT1-2. Concernant les truffes récoltées sous F10-F11 elles présentent les deux types de compatibilité sexuelle en fonction de leur localisation dans le brûlé (Figure 3.5).

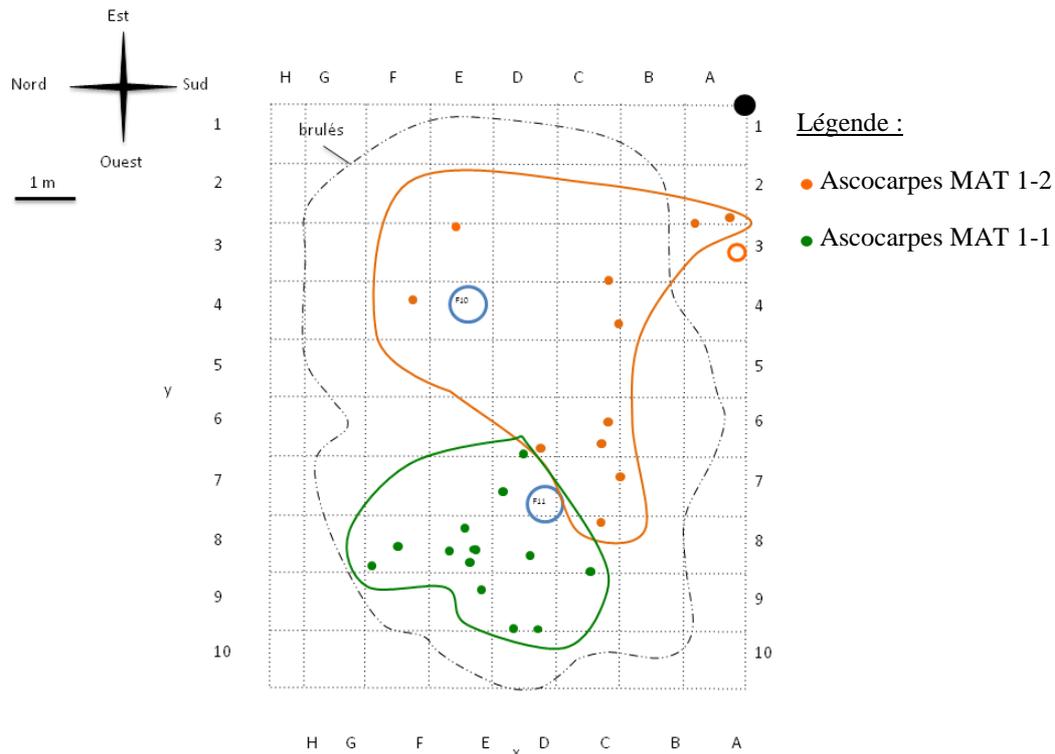


Figure 3.5 : Distribution spatiale des types de compatibilité sexuelle des ascocarpes autour de F10 et F11 pour la saison 2011-2012

Pour les autres truffes, un seul type sexuel a été retrouvé pour tous les échantillons d'un même arbre (Figure 3.6).

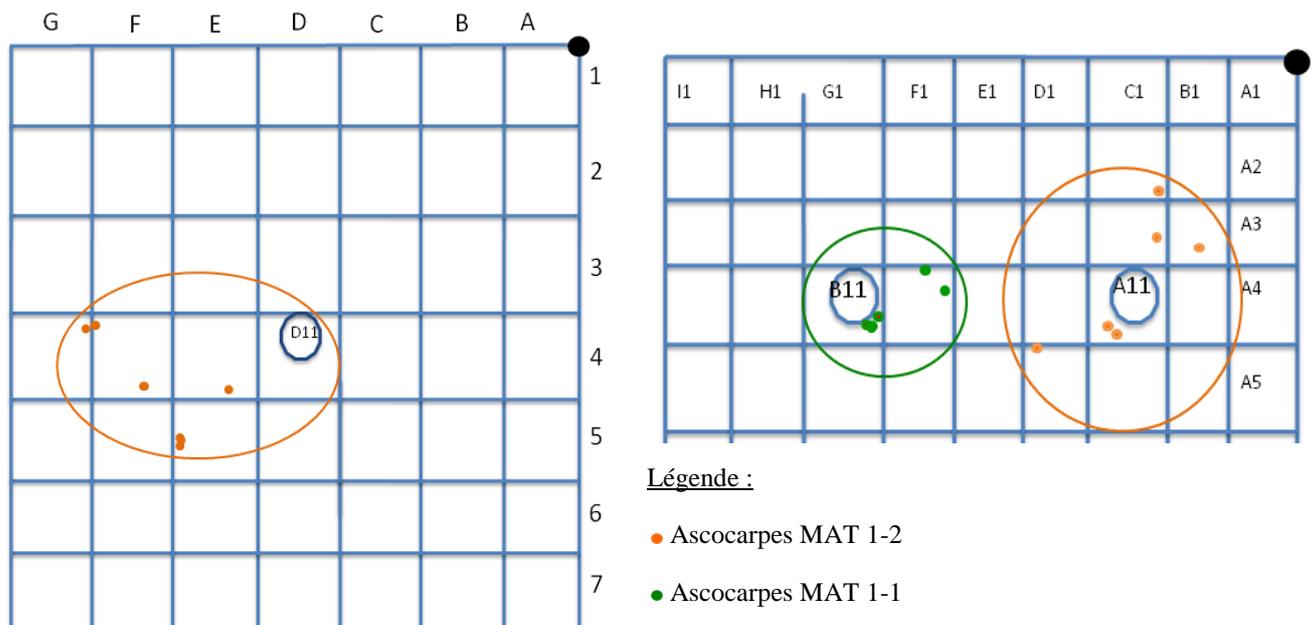


Figure 3.6 : Distribution spatiale des types de compatibilité sexuelle des ascocarpes autour de A11, B11, D11 pour la saison 2011-2012

### 3.2.3 Comparaison avec la distribution des types de compatibilité sexuelle pour la saison précédente

Les types de compatibilité sexuelle sont à chaque fois distribués par patch, les MAT1-1 autour de F11 et les MAT1-2 autour de F10, la répartition étant similaire entre les deux saisons.

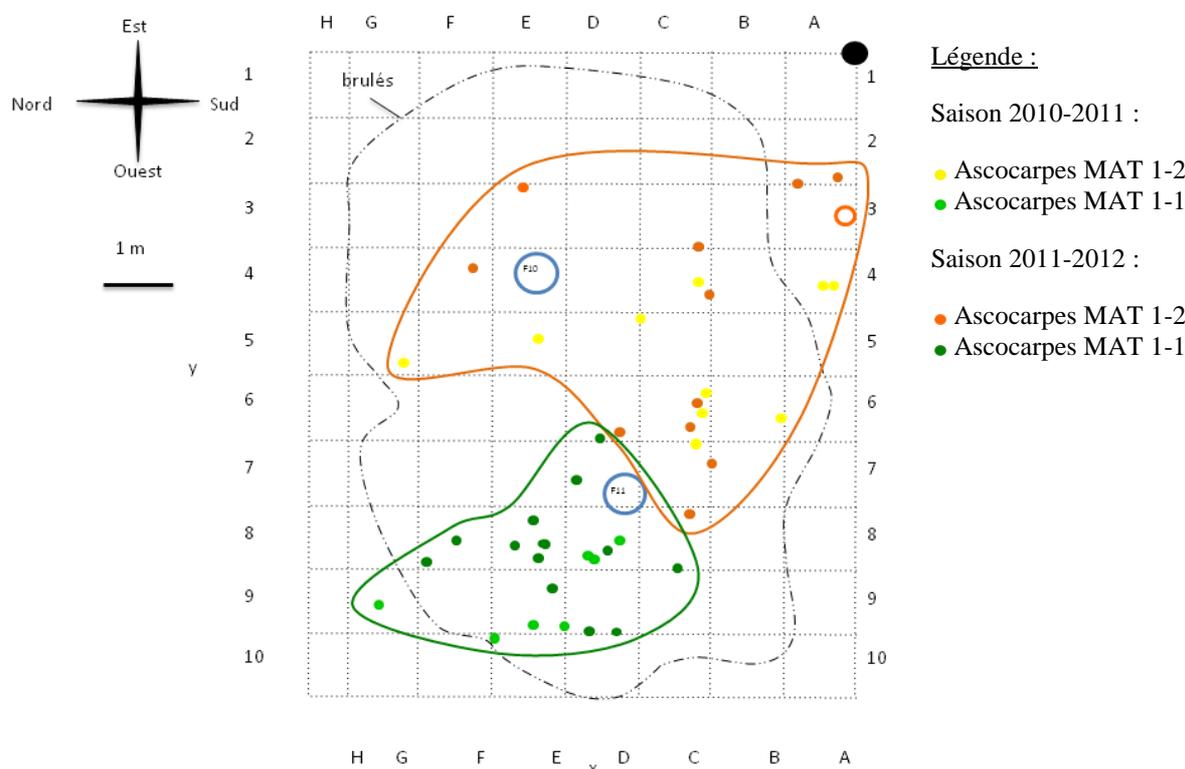


Figure 3.7 : Superposition de la répartition des types de compatibilité sexuelle des truffes des récoltes de 2010 et 2011 autour de F10 et F11

Notons qu'à la saison 2011-2012, les deux sexes opposés sont remontés vers la partie centrale du brûlé. Plus particulièrement, les individus de type MAT1-2 semblent étendre leur aire vers celle des individus MAT1-1, ce qu'on peut mettre en relation avec la présence dans le sol du MAT1-2 observée sur l'ensemble du brûlé et avec l'hypothèse d'une propension ou d'une capacité plus importante des individus MAT1-2 à coloniser l'espace.

On peut aussi supposer que les deux truffes récoltées chaque saison à proximité du petit chêne E10 y sont certainement associées. Par conséquent, E10 serait donc affilié au MAT 1-2 comme F10.

## 3.3. Analyse de la distribution des génotypes

### 3.3.1 Répartition des génotypes pour la saison 2011-2012

Les 9 microsatellites utilisés ont permis d'identifier 21 génotypes parmi les 44 truffes. Sous les arbres F10 et F11, on obtient 13 génotypes différents, dont 7 MAT 1-1 et 6 MAT1-2 (pour 24 truffes<sup>8</sup>) contre 7 génotypes différents, dont 2 MAT 1-1 et 5 MAT 1-2 pour 17 truffes en 2010-2011. Cette année, on a donc en moyenne sous F10 et F11 1,8 truffe par génotype contre 2,4 individus par génotype pour la saison dernière.

<sup>8</sup> NB : La récolte sous F10 et F11 était de 25 truffes mais un des ADN n'a pas amplifié avec les amorces SSR

Sur les 13 répertoriés sous F10 et F11<sup>9</sup> au niveau des ascocarpes en 2012, seuls 3 sont communs aux deux saisons : B, F et C. Il est intéressant de noter que ces trois génotypes se sont déplacés (cf § 3.8).

Concernant les truffes récoltées sous les autres arbres, de nouveaux génotypes ont été trouvés ainsi que de nouveaux allèles. Aucun génotype n'est partagé à plusieurs arbres.

Genotype	Arbre	MAT	Tm241_TAA17	Tm2_TAT15	Tm98_TAT15	Tm112_TAT19	Tm9_ATCA12	Tm1_ATTG18	Tm75_GAAA14	Tm22_CCTCAT17	Tm269_TGTTGC15
			250-259(3)	144-231(3)	204-255(3)	248-323(3)	302-354(4)	304-372(4)	315-355(4)	312-354(6)	338-398(6)
A	D11	2	256	156	203	254	330	305	339	332	373
B	F10/F11	1	256	208	225	249	330	305	325	362	373
B2	F10/F11	1	256	208	225	249	330	305	325	362	422
C	F10/F11	2	253	165	225	249	330	346	339	343	373
C1	F10/F11	1	256	165	225	249	330	305	339	362	373
D	B11	1	256	208	203	268	330	346	325	332	360
D1	B11	1	250	208	225	249	330	305	325	362	373
D2	B11	1	256	208	203	268	330	346	325	362	360
E	A11	2	256	208	225	249	330	346	325	326	373
F	F10/F11	2	256	208	225	249	330	346	339	332	373
G	F10/F11	2	256	156	225	249	338	346	339	326	373
H	D11	2	256	208	203	252	330	346	339	362	373
I	F10/F11	1	256	208	225	230	330	305	325	362	373
J	E10	2	256	208	230	271	330	346	325	332	373
J'	F10/F11	2	256	208	225	249	330	346	339	326	386
K	F10/F11	2	256	156	225	249	330	346	339	332	373
L	F10/F11	1	256	208	225	249	424	305	325	362	373
N	F10/F11	1	256	208	225	254	330	305	325	362	373
O	F10/F11	1	256	208	225	249	330	305	325	343	373
P	D11	2	256	156	203	241	330	285	339	332	373
Q	D11	2	256	208	225	254	330	305	339	332	373

Tableau 3.2 : Descriptif des 21 génotypes identifiés en 2012 pour chaque marqueur microsatellite

<sup>9</sup> NB : les deux truffes de génotype J récoltées à proximité du chêne E10 sont considérées comme appartenant au brûlé F10-F11

On trouve en général plusieurs génotypes sous chaque arbre, excepté pour A11, associé à un seul génotype. Sur certains points de récolte où deux ou trois truffes avaient été ramassées aux mêmes coordonnées, il arrive qu'une ou deux truffes soient de génotypes différents : par exemple, dans le carré E5 sous l'arbre D11, les truffes de génotypes A et P ont été récoltées aux mêmes coordonnées (Figure 3.9).

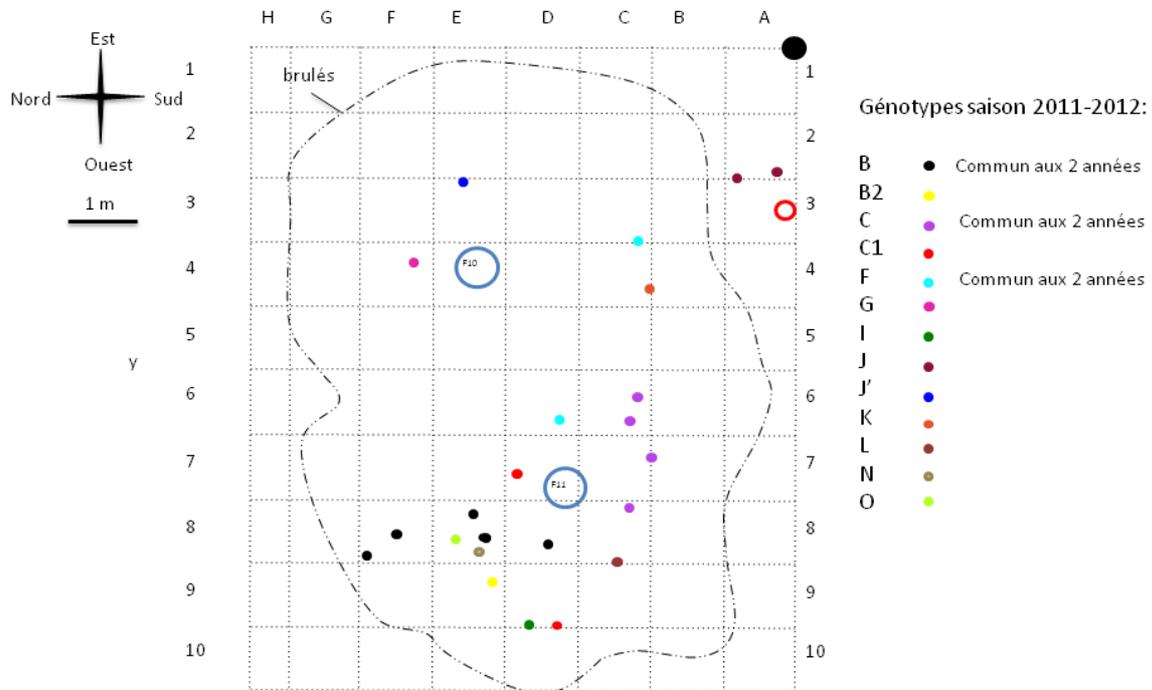


Figure 3.8 : Distribution des génotypes des ascocarpes autour de F10 et F11 pour la saison 2011-2012

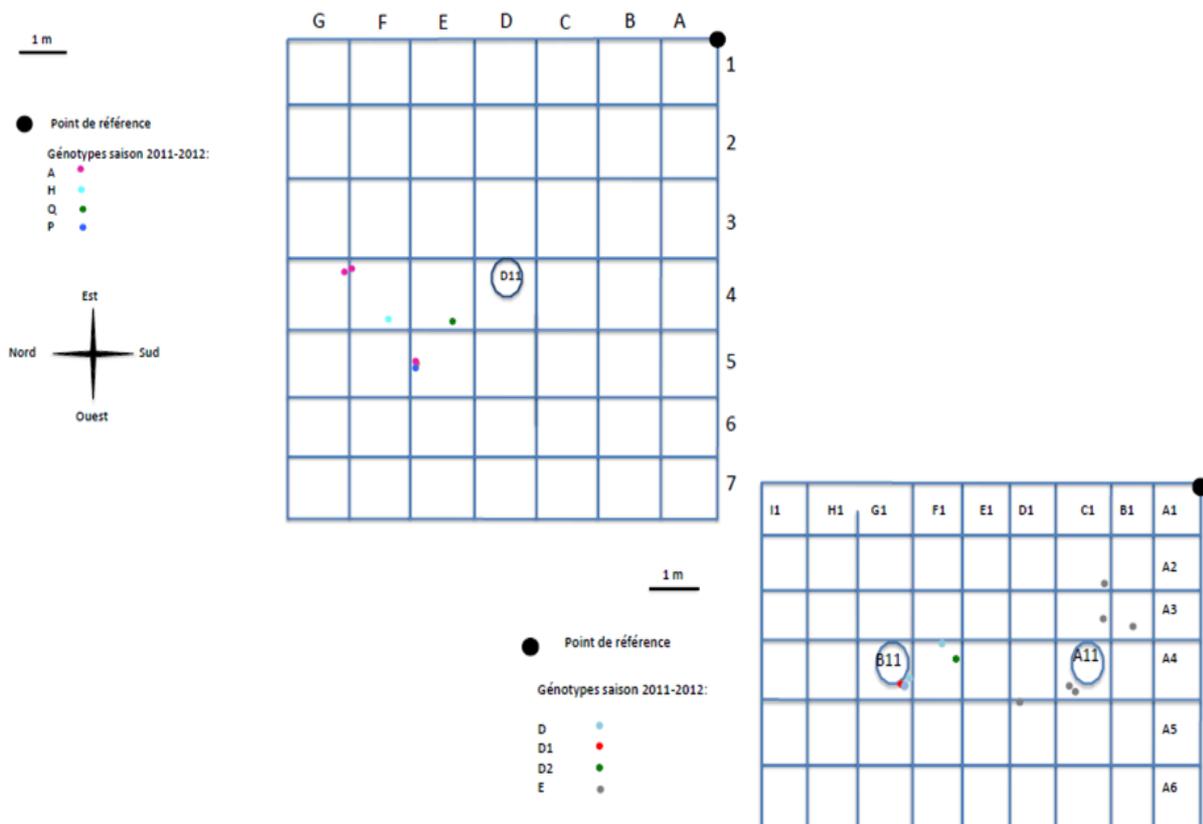


Figure 3.9 : Distribution des différents génotypes autour de A11, B11 et D11 pour la saison 2011-2012

Cette cartographie de la position des différents géotypes nous permet d'estimer la taille maximum des géotypes. Sous l'ensemble des arbres nous n'avons pas retrouvé de géotype ayant une taille supérieure à 3 m<sup>2</sup>. Nous confirmons ainsi les résultats de l'année dernière sur le fait que *T. melanosporum* a des géotypes de petite taille (De la Varga et al. 2011, en cours).

### 3.3.2 Mise en évidence d'un déplacement de géotypes entre les deux saisons

De façon générale, il semble que les trois géotypes communs aux deux saisons se soient déplacés. Les géotypes F et C, appartenant au MAT1-2, ont été retrouvés dans les mêmes zones mais aussi dans des carrés plus éloignés. Ainsi, certains individus se sont déplacés de 1 à 2 m de leur « foyer » initial de présence en 2010. De même, le géotype B de MAT1-1 s'est nettement déplacé entre les deux saisons. Les individus B sont remontés de plus de 1 m vers le centre du brûlé.

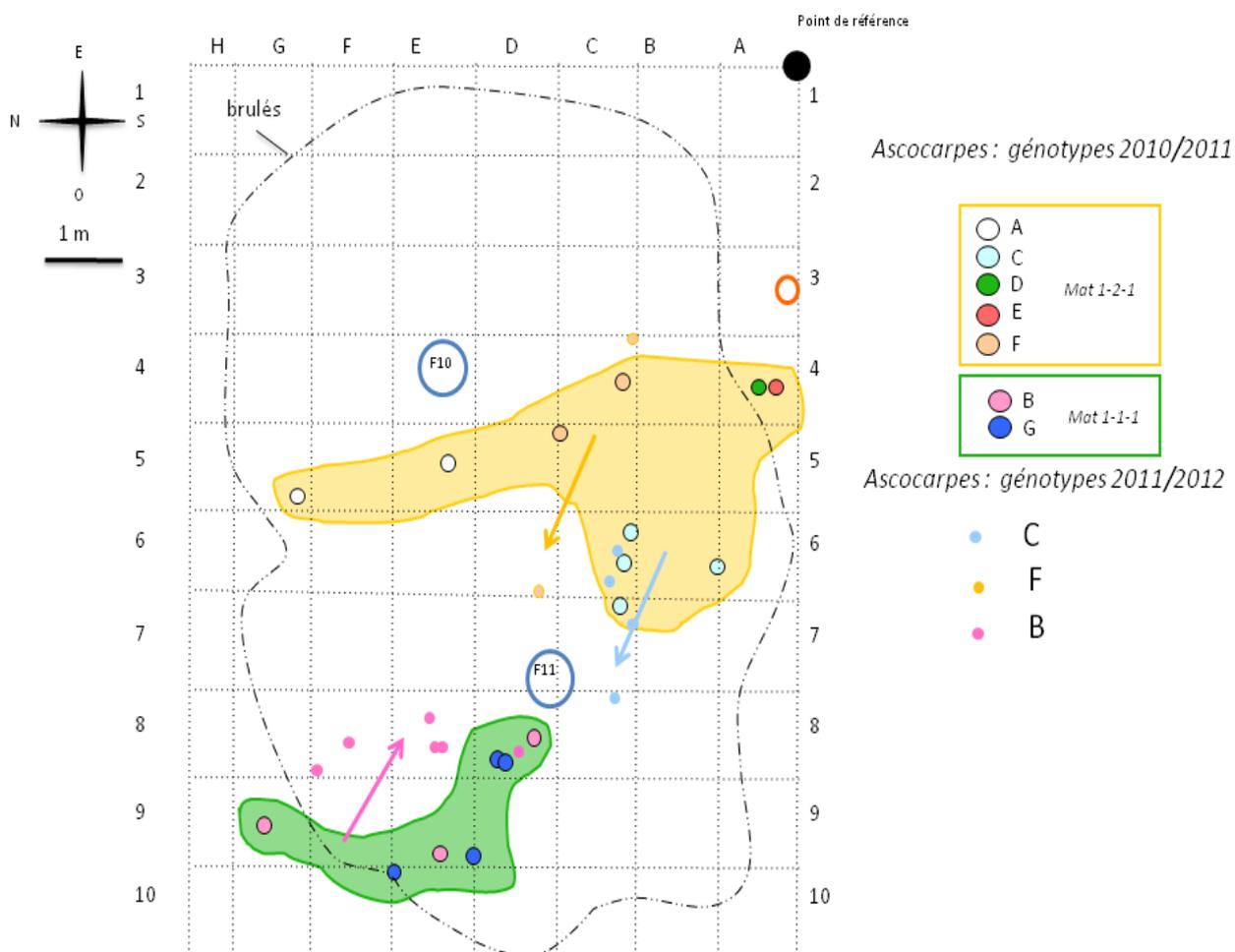


Figure 3.10 : Superposition de la répartition des géotypes B, C et F entre 2010 et 2012 autour de F10 et F11

On peut alors se demander si ces carrés producteurs de truffes cette année étaient occupés par des mycorhizes des mêmes géotypes l'an dernier. D'après la carte de géotypage des mycorhizes pour la saison 2010-2011, les carrés producteurs de truffes C en 2012 étaient colonisés par des mycorhizes des mêmes géotypes lors de la saison précédente.

En revanche, parmi les carrés ayant produit des truffes B cette année, seul D8 présentait des mycorhizes B, les autres étant largement colonisés par des mycorhizes de génotype G, pas retrouvé en 2012.

### 3.4. Analyse de la structure génétique spatiale

#### 3.4.1 Vérification statistique des génotypes

Le logiciel MLGSIM renvoie le nombre exact de génotypes identifiés à partir d'un fichier récapitulatif des combinaisons de marqueurs pour chacune des 60 truffes récoltées en 2010-2011 et en 2011-2012.

Les individus partageant les mêmes combinaisons alléliques sont dénommés par le même numéro de MLG (multilocus genotypes). 25 MLG différents sont bien identifiés dont 15 présents uniquement sur un individu isolé et 10 partagés par des clones. Il est donc considéré que tous les ascocarpes de même génotype constituent des clones, donc un même individu.

Ceci peut être confirmé par la valeur de  $P_{sex}$  qui correspond à la probabilité de trouver autant de MLG identiques qu'observés dans une population panmictique, c'est-à-dire où les individus sont répartis de façon homogène (Stenberg et al. 2003). Plus la valeur de  $P_{sex}$  est faible, plus on est certain d'avoir de vrais clones, issus de reproduction clonale (Stenberg et al. 2003).

Le nombre de répétitions de l'algorithme étant de 1000, on considère que des individus de génotypes identiques sont de vrais clones si leur valeur de  $P_{sex}$  est inférieure à  $10^{-3}$  (Keeney et al. 2008). Cette valeur est la même pour tous les clones. Pour chaque génotype partagé par deux truffes ou plus, les valeurs de  $P_{sex}$  sont très faibles, entre  $7 \times 10^{-3}$  et 0.

De plus, les p-values sont inférieures au risque fixé de 5% ou 1%. Ces résultats sont donc significatifs.

$$P\text{-Value}(0.01) = 5.07227 \times 10^{-5}$$

$$P\text{-Value}(0.05) = 0.000529998$$

Il est donc possible de ne considérer par la suite qu'un seul individu par génotype, chaque truffe correspondant à un vrai clone d'un même génotype.

#### 3.4.2 Réalisation de corrélogrammes

Les corrélogrammes représentant le coefficient de parenté contre la distance géographique sont présentés dans la figure 3.11.

Pour les trois corrélogrammes, la même tendance est observée : il y a une diminution du coefficient de parenté avec l'éloignement géographique. En revanche, on observe aussi une augmentation des valeurs pour des distances plus grandes ce qui indique que des génotypes éloignés géographiquement peuvent aussi avoir un coefficient de parenté positif.

En comparant les génotypes des deux saisons sous les arbres F10 et F11 nous observons que les génotypes ont un coefficient de parenté plus élevé s'ils sont présents à des intervalles de distance courts dans les deux saisons.

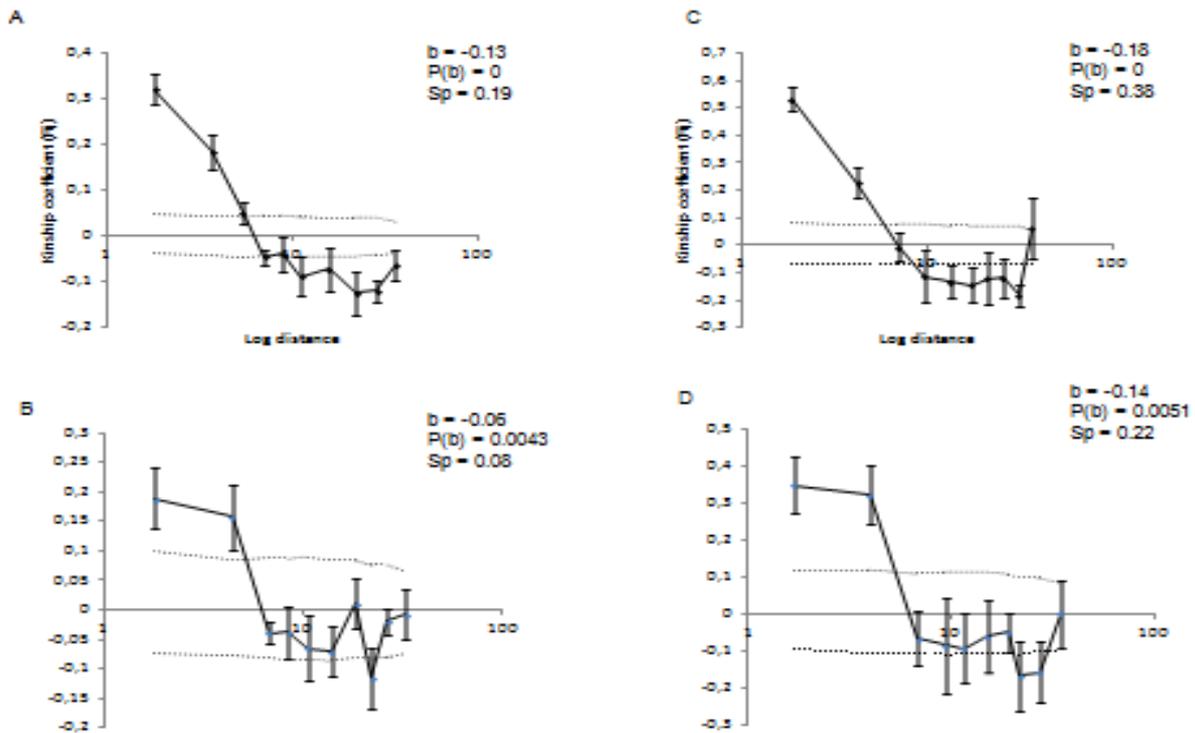


Figure 3.11 : Corrélogrammes représentant le coefficient de parenté contre la distance géographique pour tous les ascocarpes (A) et de tous les génotypes (B) récoltés durant les deux saisons, et pour tous les ascocarpes (C) et tous les génotypes (D) de la saison 2011-2012.

Pour les corrélogrammes B et D, on a utilisé la coordonnée centrale de tous les clones.

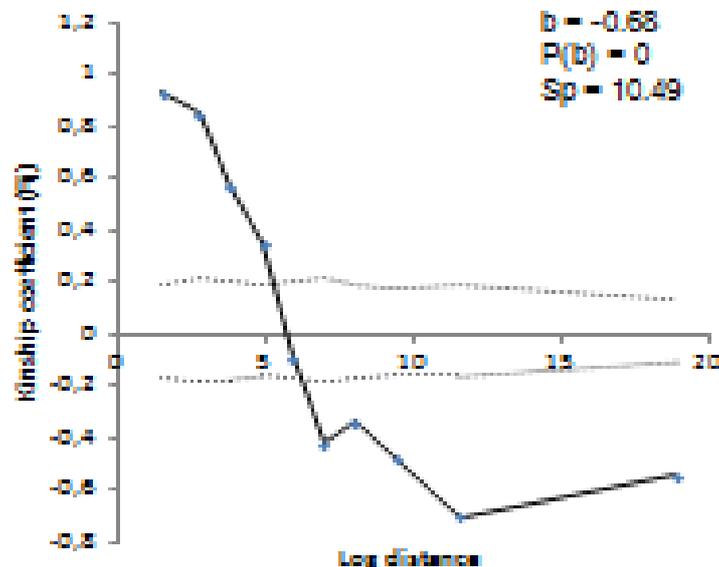


Figure 3.12 : Corrélogramme représentant le coefficient de parenté en fonction de la distance géographique pour tous les ascocarpes récoltés en 2010-2011 contre ceux récoltés en 2011-2012 sous F10 et F11

Pour ce corrélogramme, seul le locus de compatibilité sexuelle a été pris en compte. Les lignes brisées sur les figures 3.11 et 3.12 correspondent à l'intervalle de confiance de 95% pour l'hypothèse nulle d'une distribution spatiale aléatoire des génotypes.

La pente  $b$  est statistiquement différente de 0 donc il existe une corrélation entre les distances géographiques et les distances génétiques. Ceci met en évidence un isolement par la distance. Cet isolement est vrai pour des distances courtes mais cette structure n'est plus valable pour d'autres distances.

Le calcul de l'indice  $S_p$  met en évidence une structure génétique spatiale puisque ses valeurs sont toujours supérieures à 0. Plus la valeur de l'indice  $S_p$  est haute, plus la structure génétique spatiale est forte.

La figure 3.12 montre qu'un échantillon récolté en 2011-2012 a une forte probabilité d'avoir le même type de compatibilité sexuelle qu'un échantillon récolté dans le même carré l'année précédente. Cela indique que la distribution des types de compatibilité sexuelle s'est maintenue entre les deux saisons.

### 3.4.3 Identification des populations par Geneland

Sans le locus de type de compatibilité sexuelle et en ne considérant que les marqueurs neutres, l'algorithme Geneland identifie une seule population. Ceci indique l'existence d'un brassage entre tous les individus récoltés sous les différents arbres, qui ne constituent donc qu'une seule population.

Lorsqu'on inclut le locus de compatibilité sexuelle à l'analyse, en revanche, Geneland identifie deux populations (clusters). Un premier cluster correspond aux génotypes de type de compatibilité sexuelle MAT 1-1 (cluster comprenant les truffes sous B11 et F11), et un second cluster se réfère aux génotypes de type MAT 1-2 (cluster comprenant les individus sous A11, D11 et F10). Ces résultats sont montrés sur la figure 3.13. La position des arbres est indiquée.

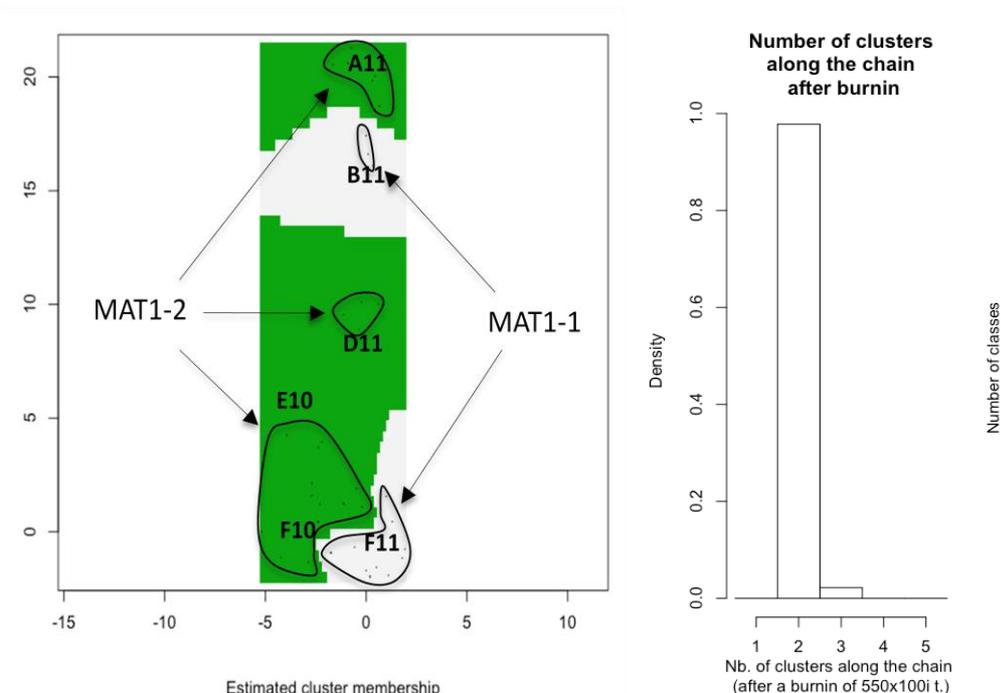


Figure 3.13 : Nombre de clusters identifiés par Geneland en tenant compte du locus de compatibilité sexuelle et plan de la truffière avec la position des génotypes (point noirs) et leur probabilité d'appartenir à une population (cluster).

Ces résultats indiquent l'existence de deux populations distinctes, structurées par le type de compatibilité sexuelle. Ils mettent en évidence une distribution non aléatoire des types de

compatibilité sexuelle sur le site d'étude, et confirment les observations faites suite à l'identification par PCR des types de compatibilité sexuelle.

### 3.5. Récapitulatif des résultats

- ✓ Les ascocarpes ne se développent pas aux mêmes endroits d'une année sur l'autre.
- ✓ La distribution par patch de type de compatibilité sexuelle identique demeure la même : un arbre est associé à un type de compatibilité sexuelle.
- ✓ La majorité des génotypes de l'année 2012 sont nouveaux. Seuls trois sont communs aux deux années.
- ✓ Pour les génotypes présents sur les deux saisons, il y a un déplacement notable, convergeant vers la partie centrale du brûlé, et un phénomène de compétition entre les individus colonisant les racines.
- ✓ Il existe des liens de parenté entre des génotypes proches géographiquement mais aussi plus éloignés. Le calcul de l'indice Sp n'a pas permis de mettre en évidence une structure génétique spatiale. Par contre l'analyse Geneland a mis en évidence deux populations. Enfin, il semble que le locus du type de compatibilité sexuelle soit un facteur structurant au sein de la truffière.

## IV. DISCUSSION

### 4.1. La colonisation des racines par la truffe est-elle liée au type de compatibilité sexuelle ?

Les résultats de cette étude montre une séparation stricte entre les zones de localisation des deux types de compatibilité sexuelle. Un arbre semble donc associé exclusivement à un sexe. Des études précédentes démontrent que la même répartition existe aussi au niveau des ectomycorhizes récoltées à proximité des fructifications (cf Figure 4.1 ; Rubini et *al.* 2011 ; De la Varga et *al.* 2011, en cours).

Cette distribution par patch des types de compatibilité sexuelle opposés sur l'espace d'étude n'est pas commune à tous les Ascomycètes, mais il existe peu de travaux sur la distribution *in situ* des types de compatibilité sexuelle sur un site expérimental.

Chez *Phialocephala fortinii* par exemple, un autre Ascomycète hétérothallique, les deux types de compatibilité sexuelle ont été trouvés sur l'ensemble du terrain d'étude, sans faire preuve d'une répartition distincte comme chez la truffe noire (Zaffarano et *al.* 2008).

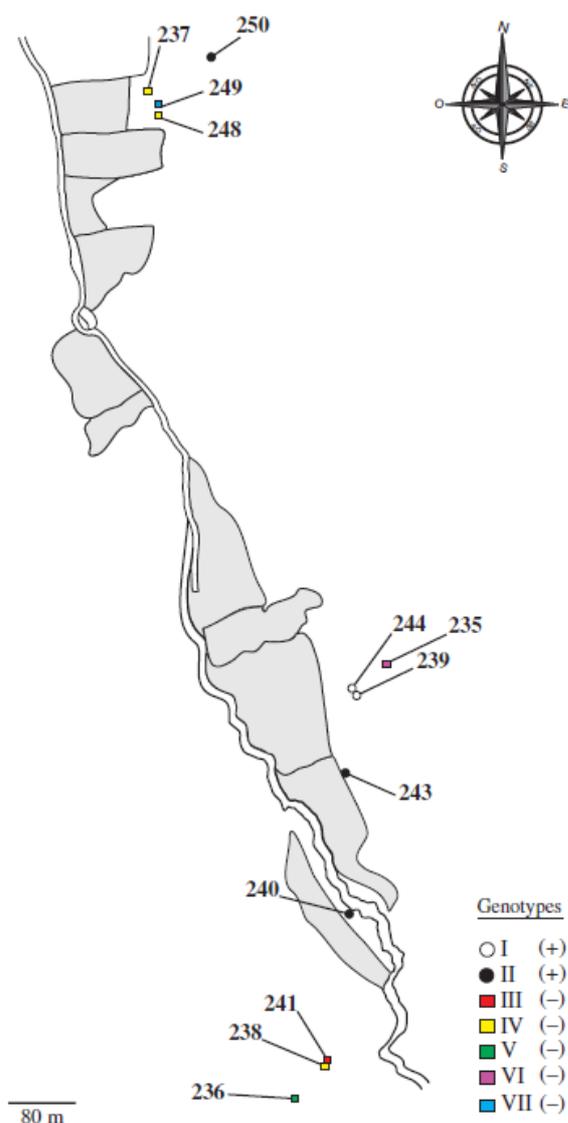


Figure 4.1 : Répartition des types de compatibilité sexuelle et des génotypes sur la truffière de Borgo Cerrato, Italie (Rubini et al. 2011)

La colonisation des racines de la plante-hôte est donc effectuée par des individus du même type de compatibilité sexuelle. En revanche, il s'agit d'individus différents puisqu'on retrouve, sous un même arbre, divers génotypes distincts appartenant au même sexe. Cette répartition très localisée des individus de types de compatibilité sexuelle opposés pourrait être liée à l'existence de phénomènes de compétition intraspécifique pour la colonisation racinaire entraînant une incompatibilité entre les deux sexes opposés.

Ainsi, Rubini et al. (2011) précisait que la distance minimale observée entre deux individus de sexes opposés était de 50 cm. Ceci est vérifié presque systématiquement à Rollainville (environ 1 m) excepté autour de F11 où deux ascocarpes de sexes opposés ont été récoltés à une trentaine de centimètres de distance l'un de l'autre (Figure 3.5). L'accomplissement de la reproduction sexuée chez la truffe noire nécessiterait alors une dispersion importante des ascospores ainsi que des mycéliums.

Il serait intéressant d'identifier la distribution des types de compatibilité sexuelle au niveau du sol et des mycorhizes sur le site de Rollainville pour la saison 2011-2012, ce qui n'a pas pu être réalisé au cours de mon travail suite à des difficultés d'extraction de l'ADN des mycorhizes.

## 4.2. *Tuber melanosporum*, une espèce pionnière

L'analyse de génotypage sur la saison 2011-2012 a mis en évidence l'apparition de nouveaux génotypes absents lors de la saison précédente puisque seuls trois sont communs aux deux saisons de récolte (Figures 3.8 et 3.9). De plus, à la période précédente, trois génotypes avaient été identifiés seulement au niveau des mycorhizes sans être retrouvés sur des truffes. Une hypothèse était que ces génotypes seraient retrouvés la saison prochaine en produisant des ascocarpes mais ce n'est pas le cas. Ces nouveaux génotypes seraient donc nés au cours de cette année, ce qui signifierait un renouvellement rapide et dynamique des populations ainsi qu'un cycle de vie des génotypes relativement court.

Il existe deux modes de reproduction chez les Champignons, une reproduction sexuée par la dissémination de spores haploïdes, et une reproduction végétative par dispersion et développement du mycélium (cf § I.2.2). L'important renouvellement des individus d'une année sur l'autre indique que la reproduction sexuée à partir d'ascospores est prépondérante chez *Tuber melanosporum*. Mais le fait que trois génotypes aient subsisté au cours des deux saisons et qu'ils se soient déplacés de 1 à 2 m entre les deux années montre que le phénomène de reproduction par voie végétative est aussi présent (Figure 3.10).

L'analyse statistique par MLGSIM a démontré que les échantillons des deux années appartiennent bien au même génet. Des déplacements similaires d'individus au cours du temps ont été observés chez *Hebeloma cylindrosporum*, un basidiomycète pionnier associé au Pin maritime dans les forêts landaises. Sur dix ans de suivi au sein d'une placette expérimentale, des déplacements de plusieurs mètres ont été notés (Guidot *et al.* 2003). Ceci illustrerait aussi une facette de la compétition intraspécifique pour la colonisation des racines et la production d'ascocarpes : le génotype B a colonisé les zones mycorhizées par G et a pris le dessus sur ce dernier qui n'a pas fructifié à la saison 2011-2012. Le génotypage des mycorhizes de l'année permettra de le confirmer et de vérifier si G est encore présent au niveau des mycorhizes.

*Tuber melanosporum* disposerait donc d'une grande capacité de colonisation de nouvelles racines et de création de mycorhizes. Ceci est aussi à corrélérer avec le résultat de la carte en figure 3.2 : les zones ayant produit des truffes l'année 2010 n'en ont pas produit cette année et l'essentiel de la récolte de la saison 2011-2012 a été portée par de nouvelles zones certainement colonisées par des mycéliums de l'année qui ont fructifié. Cela tend à conforter l'idée d'une dynamique rapide des populations de truffes et d'un cycle de vie court.

Ces résultats corroborent ceux de De la Varga *et al.* en 2011 aboutissant à l'hypothèse que la truffe noire du Périgord serait une espèce pionnière à stratégie R (cf § I.2.2) : colonisation d'espaces ouverts dans les stades premiers de succession végétale (il est d'ailleurs observé une forte baisse voire un arrêt de la production d'ascocarpes lorsque le milieu se referme), utilisation des ressources à la reproduction sexuée (production de fructifications et de spores) et à la formation de nombreux génotypes de petite taille (moins de 3 m<sup>2</sup>) et très dispersés (en moyenne 1,8 individu par génotype cette année sous F10 et F11, § III.3.1).

Ces caractéristiques sont communes à de nombreuses espèces ectomycorhiziennes à stratégie pionnière comme *Hebeloma cylindrosporum* chez qui de très nombreux génotypes étaient identifiés chaque année au niveau des mycorhizes et des fructifications, dispersées sur des zones de taille inférieure à 0,25 m<sup>2</sup> (Gryta *et al.* 1997 ; Guidot *et al.* 2001).

Le renouvellement des génotypes traduit une focalisation de l'énergie vers la reproduction sexuée et la colonisation de nouveaux espaces, propres aux espèces de stratégie R. De tels résultats ont été obtenus chez d'autres champignons ectomycorhiziens comme *Tricholoma scalpturatum*, espèce pionnière souvent en symbiose avec des chênes pubescents et des pins

maritimes, chez qui la reproduction sexuée est prépondérante avec la formation de nombreux petits génets (inférieurs à 4 m<sup>2</sup>) qui ne sont pas retrouvés d'une saison sur l'autre. Quelques rares génets de plus grande propagation ont été identifiés et correspondent aux génotypes persistants ; ils sont issus de la reproduction végétative (Carriconde et al. 2008). C'est ce que l'on observe sur le site de Rollainville : les génotypes dont la dispersion dépasse les 3 m<sup>2</sup> correspondent aux trois génets ayant subsisté aux deux saisons et dispersés par reproduction végétative.

### 4.3. Existe-t-il des flux de gènes au sein du dispositif de Rollainville ?

Les analyses de corrélogramme montrent que les génotypes plus proches géographiquement sont aussi plus proches génétiquement. Toutefois il existe des coefficients de parenté positifs aussi entre génotypes provenant d'arbres plus éloignés. Ceci indique qu'il y a eu des échanges entre ces arbres. L'existence de flux de gènes entre les différents arbres de la truffière expliquerait l'absence de structure génétique spatiale au sein de la truffière. En effet, une structure génétique spatiale est souvent mise en évidence lorsque des barrières de flux de gènes existent empêchant les échanges.

Geneland a identifié une seule population lorsque uniquement les marqueurs neutres microsatellites ont été pris en compte. Ce résultat confirme qu'il existe des liens de parenté entre génotypes appartenant à des truffes présentes sous différents arbres. Il n'y a donc pas de barrière aux flux de gènes.

Lorsque le locus du type de compatibilité sexuelle est ajouté pour définir les génotypes, Geneland identifie deux populations. La population 1 correspond aux génotypes ayant le MAT 1-1 et la population 2 aux génotypes ayant le MAT 1-2.

Ce résultat montre le locus de compatibilité sexuelle comme un facteur structurant pour la truffière de Rollainville. Ceci confirme la distribution non aléatoire des génotypes des deux types de compatibilité sexuelle dans la truffière comme discuté précédemment. Par contre, il est encore impossible de déterminer si le locus du type de compatibilité sexuelle est lui-même structurant ou bien s'il s'agit d'un ou de plusieurs marqueurs qui lui sont proches. Malheureusement, il est impossible à l'heure actuelle de savoir quels gènes sont proches du locus de compatibilité sexuelle puisque celui-ci est présent sur une petite fraction du génome de la truffe noire.

Le suivi de la récolte de truffe à Rollainville va se poursuivre dans les prochaines années. Ceci devrait permettre de détecter plus précisément les échanges qui existent entre les arbres par des tests de parentés.

### 4.4. Que nous enseignent ces résultats pour le trufficulteur ?

Les analyses qui ont été menées ont pour but de mieux connaître la biologie et l'écologie de la truffe noire en gardant à l'esprit que l'objectif final est de fournir des outils et/ou des recommandations pour le trufficulteur. Ces travaux montrent que les truffières sont un espace dynamique qui évolue en continuation avec des échanges entre les arbres et aussi probablement entre les truffières. Comme nous l'avons vu *T. melanosporum* privilégie la reproduction sexuée comme mode de dissémination. La présence des deux types de compatibilité sexuelle, en proportions équivalentes sur la truffière, est alors indispensable. Il serait d'ailleurs intéressant de connaître la structure génétique des populations de truffes, et la distribution des types de compatibilité sexuelle au niveau des truffières non productrices (en utilisant les mêmes outils moléculaires au niveau des mycorhizes et du mycélium).

Il semble aussi que les échanges de spores dans les truffières soient primordiaux pour permettre aux individus de se rencontrer. Tout ce qui peut favoriser ces échanges doit être préconisé comme un travail du sol d'arbre en arbre. D'autre part, il semble important qu'un potentiel d'inoculum persiste dans la truffière ce qui indiquerait qu'il vaudrait mieux ne pas récolter toutes les truffes.

Dans les faits, les trufficulteurs laissent déjà sur site les truffes qui sont abimées (gelées ou grignotées). Une autre possibilité serait un apport régulier de spores. Ceci est déjà réalisé dans de nombreuses truffières sans toutefois en connaître l'effet réel. Les outils utilisés au cours de ce travail pourraient permettre de suivre le devenir des spores introduites et surtout de savoir si elles contribuent à la reproduction sexuée de la truffière.

Enfin tous ces résultats ont été obtenus pour *T. melanosporum*, mais qu'en est-il pour les autres truffes ? Prenons l'exemple de la truffe de Bourgogne *T. aestivum* qui est la truffe la plus fréquente dans les forêts en Europe. Cette espèce à la différence de *T. melanosporum* se rencontre dans des milieux plus fermés. Nous pouvons nous demander si cette espèce tout comme *T. melanosporum* investit plus dans la reproduction sexuée que dans la reproduction végétative.

## CONCLUSION

La filière truffe a un rôle non négligeable dans l'économie de plusieurs régions de France ainsi que dans leur identité culturelle et patrimoniale et dans le rayonnement de la gastronomie française. La trufficulture est alors un outil de développement des territoires ruraux, avec un impact paysager important : maintien des espaces ouverts, lutte contre la propagation des feux dans des régions très touchées par des problématiques d'incendies dans le Sud de la France, réhabilitation de terres délaissées, mise en place d'une agriculture extensive et peu anthropisée. Mais les scientifiques poursuivent leurs recherches sur la compréhension de ces champignons dans plusieurs pays notamment d'Europe du Sud avec des projets comme le projet français SYSTRUF. Parmi de nombreuses thématiques développées, la connaissance de la dynamique et de la génomique des populations ainsi que de la reproduction des truffes constitue des enjeux de taille pour la trufficulture et permettrait des applications facilitant l'obtention d'ascocarpes dans les plantations truffières.

La mise en place du dispositif expérimental de Rollainville et les travaux qui y sont menés depuis quelques années ont permis d'avancer dans la connaissance de l'écologie et de la structure génétique des populations de truffes noires du Périgord. On a pu confirmer la distribution spatiale des types de compatibilité sexuelle sous les arbres de la truffière. Cette localisation se maintient donc d'une saison de production sur l'autre. De plus, les analyses de génotypage ont montré un renouvellement important des génotypes ainsi que leur déplacement au sein du brûlé. Ceci met en évidence des phénomènes de compétition intraspécifique entre les individus et renforce la théorie d'une stratégie pionnière de la truffe noire, reposant sur une reproduction sexuée importante.

Les études statistiques de la structure génétique évoquent des flux de gènes entre les individus présents sous les différents arbres du site d'étude.

Ces résultats pourront aboutir au développement de techniques de trufficulture et d'inoculation pouvant favoriser les échanges de gènes et la reproduction sexuée au sein des truffières, donc la production de fructifications.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bertault G., Rousset F., Fernandez D., Berthomieu A., Hochberg M., Callot G., Raymond M. 2001. Population genetics and dynamics of black truffle in a man-made truffle field. *The Genetics Society of Great Britain*, 86, 451-458
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R, 2010. A global meta-analysis of Tuber ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long distance dispersal. *Molecular Ecology*, 19, 4994-5008.
- Callot G. 1999. La truffe, la terre, la vie. *Editions INRA*. 209 p.
- Carriconde F. 2008. Dispersion et colonisation chez le champignon ectomycorhizien *Tricholoma scalpturatum*. *Thèse de doctorat*, 177 p.
- Carriconde F., Gryta H., Jargeat P., Mouhamadou B., Gardes M. 2008. High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. *Molecular Ecology*, 4433-4445
- Ceruti A., Fontana A., Nosenzo C. 2003. Le specie europee del genere *Tuber*, una revisione storica. *Museo Regionale di Scienze Naturali, monografie XXXVII*
- Chevalier G., Frochot H. 1997. La maîtrise de la culture de la truffe. *Revue Forestière Française XLIX*, n°sp. p. 201-213
- Chevalier G. 2007. La culture de la truffe dans le monde. *Acte du colloque de Brive-La-Gaillarde de 2007*
- De la Varga H., Rubini A., Akroume E., Riccioni C., Belfiori B., Guaragno M., Le Tacon F., Robin C., Halkett F., Martin F., Murat C. Paolocci F. 2012. Fine scale spatial genetic structure of the black truffle *Tuber melanosporum* investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes, *en cours*
- Diette S., Lauriac A. 2004. La sylviculture truffière : aperçus historiques, apports techniques et enjeux pour la forêt méditerranéenne. *Revue Forestière Français LVI*
- Douhan G., Vincenot L., Gryta H., Selosse M-A. 2011. Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biology*, 115, 569-597
- Escafre A., Roussel F. 2006. Rapport relatif au développement de la trufficulture française. *CGAAER n°1132*
- Fasolo-Bonfante P, Fontana A., Montacchini F. 1971. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. Dimostrazione di un effetto fitotossico. *Allionia*, 17, 47-54.
- Fédération Française des Trufficulteurs. 2005. L'impact socio-économique de la trufficulture sur le développement local. *Etude FFT-FNDAT*
- Gryta H., Debaud J-C, Effosse A., Gay G., Marmeisse R. 1997. Fine-scale structure of population of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology*, 6, 353-364

- Guidot A., Debaud J-C, Marmeisse R. 2001. Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology*, 10, 1121-1131
- Guillot G., Mortier F., Estoup A. 2005b. Geneland: A computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3):708-711
- Ivens A.B.F., Van de Sanden M., Bakker J. 2012. MLGsim 2.0, *User manual*
- Jonhson D., Martin F., Cainrey J., Anderson I.C. 2012. The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New phytologist*
- Keeney D.B., Bryan-Walker K., King T.M., Poulin R. 2008. Local variation of within-host clonal diversity coupled with genetic homogeneity in a marine trematode. *Mar Biol*, 154, 183-190
- Kües U., Martin F. 2011. On the road to understanding truffles in the underground. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 555-560
- Lauriac A. 2009. Sous les forêts, la truffe... *Forêt entreprise n°160*. 10 p.
- Lauriac A. 2010. La sylviculture truffière. *CRPF Languedoc-Roussillon*
- Loiselle, B.A., V.L. Sork, J. Nason, and C. Graham. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 82:1420-1425
- Martin F., Kohler A., Murat C., Balestrini R., Coutinho P., Jaillon O., Montanini B., Morin E., Noel B., Percudani R., Porcel B., Rubini A., Amicucci A., Amselem J., Anthouard V., Arcioni S., Artiguenave F., Aury J-M, Ballario P., Bolchi A., Brenna A., Brun A., Buée M., Cantare B., Chevalier G., Couloux A., Da Silva C., Denoeud F., Duplessis S., Ghignone S., Hilselberger B., Iotti M., Marçais B., Mello A., Miranda M., Pacioni G., Quesneville H., Riccioni C., Ruotolo R., Splivallo R., Stocchi V., Tisserant E., Roberto Viscomi A., Zambonelli A., Zampieri E., Henrissat B., Lebrun M-H, Paolocci F., Bonfante P., Ottonello S., Wincker P., 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis, *Nature*, 464, 1033-1038
- Murat-Furminieux C. 2004. Etude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum* Pico) et de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Thèse de doctorat*, 159 p.
- Murat C., Diéz J., Luis P., Delaruelle C., Dupré C., Chevalier G., Bonfante P., Martin F. 2004. Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New phytologist*, 164, 401-411
- Murat C., Riccioni C., Belfiori B., Cichocki N., Labbé J., Morin E., Tisserant E., Paolocci F., Rubini A., Martin F. 2010. Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers, *Fungal Genetics and Biology*, 48, 592-601
- Pépinières Robin. Mycorrhization contrôlée et godets Robin anti-chignon. *Plaquette*, 28 p.
- Pousse J-S. 2009. La filière truffe du Grand Est de la France. *Projet de développement. Contrat interprofessionnel de Progrès*

- Riccioni C., Belfiori B., Rubini A., Passeri V., Arcioni S., Paolocci F. 2008. *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New phytologist*, 180, 466-478
- Robinet R. 2009. Référentiel technico-économique de la culture de la truffe en Lorraine. Service économique de la CRAL. 31 p.
- Rubini A., Belfiori B., Riccioni C., Arcioni S., Martin F., Paolocci F. 2011. *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strain of different mating type of the roots of nursery-inoculated host plants. *New phytologist*, 189, 723-735
- Rubini A., Belfiori B., Riccioni C., Tisserant E., Arcioni S., Martin F., Paolocci F. 2010. Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*, *New phytologist*, 189, 710-722
- Savignac J-C. 2011. La trufficulture française en 2011. Conférence FranceAgriMer du 25/02/11. *Fédération Française des Trufficulteurs*
- Stenberg P., Lundmark M., Knutelski S., Saura A. 2003. Evolution of Clonality and Polyploidy in a Weevil System. *Molecular Biology and Ecology*, 20, 1626-1632
- Stenberg P., Lundmark M., Saura A. 2003. MLGsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Molecular Ecology Notes*, vol.3, 329-331
- Streiblova E., Gryndlerová H., Gryndler M. 2011. Truffle brûlé : an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 1-8
- Vekemans X., Hardy O.J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13, 921-935
- Vignaud G. 2006. Accord interprofessionnel « truffes fraîches »
- WEBER JL., WONG C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2, 1123- 1128
- Zaffarano PL., Queloz V., Duo A., Grunig CR. 2011. Sex in PAC: a hidden affair in dark septate endophytes? *BMC Evolutionary Biology*, 11:82

### **Sites internet consultés:**

Alcina : <http://www.alcina.fr>

FFT : <http://www.fft-tuber.org>

Syndicat National des Pépiniéristes produisant des Plants à Vocation Truffière :

<http://pepinieristes-truffiers.com/default/page/index/idmenuelement/19/>

<http://www.ensaia.inpl-nancy.fr/marie/web/ntic/pages/2008/idier.html#%C3%A9tiquette1>

[http://www.rug.nl/fmns-research/theobio/downloads/manual\\_MLGsim2.0.pdf](http://www.rug.nl/fmns-research/theobio/downloads/manual_MLGsim2.0.pdf)

**Liste des contacts :**

François Le Tacon, Directeur de Recherche émérite, UMR Interactions Arbres Microorganismes, équipe Ecogénomique des interactions, INRA Champenoux : [le\\_tacon@nancy.inra.fr](mailto:le_tacon@nancy.inra.fr)

Francis Martin, Directeur de Recherche, chef de l'équipe Ecogénomique des interactions de l'UMR IAM, INRA Champenoux : [fmartin@nancy.inra.fr](mailto:fmartin@nancy.inra.fr)

Claude Murat, Ingénieur de Recherche, UMR Interactions Arbres Microorganismes, équipe Ecogénomique des interactions, INRA Champenoux : [claudemurat@nancy.inra.fr](mailto:claudemurat@nancy.inra.fr)

Christophe Robin, Directeur de Recherche, UMR ENSAIA-INRA "Agronomie et Environnement" Nancy-Colmar : [Christophe.Robin@ensaia.inpl-nancy.fr](mailto:Christophe.Robin@ensaia.inpl-nancy.fr)



## **RESUME**

Ce mémoire de fin d'études d'ingénieur forestier présente mon travail au sein de l'unité mixte de recherche Interactions Arbres-Microorganismes (INRA Champenoux) sur la thématique de la structure génétique d'une population de truffes noires du Périgord, espèce très appréciée en gastronomie.

Les truffes sont des champignons ectomycorhiziens vivant en symbiose avec de nombreux arbres. Récemment, son génome a été entièrement séquencé et il a été démontré qu'elle présentait un mode de reproduction sexuée. L'objectif de cette étude est de cartographier la répartition des deux types de compatibilité sexuelle et des génotypes de *Tuber melanosporum* sur une plantation truffière située à Rollainville (88). Elle a permis de consolider la théorie d'une stratégie d'espèce pionnière de *Tuber melanosporum*, utilisant ses ressources énergétiques à la colonisation des nouveaux espaces et à la reproduction sexuée. Ce travail a ainsi montré qu'une truffière était animée d'une forte dynamique de population. Cette compréhension de la distribution des individus au sein de la truffière offre des pistes de réflexion, qui pourraient apporter des éléments majeurs pour favoriser la production de fructifications de truffe noire, avec des répercussions importantes sur l'ensemble de la filière trufficole.