

CONTRIBUTION A L'ETUDE D'UNE ESPECE DE MORILLE
DE LA FORET ALLUVIALE RHENANE : Morchella rotunda (Pers.) Boudier
PERSPECTIVES DE DOMESTICATION

par

François BUSCOT*

Sous une forme monographique, le travail exposé étudie, au plan fondamental, l'écologie, la biologie et la physiologie de Morchella rotunda (Pers.) Boudier et, sur ces bases, tente d'expliquer plus d'un siècle d'échecs dans les tentatives de culture des morilles et de définir quelques pistes de recherche pour obtenir la domestication de ce macromycète.

La première partie du mémoire est consacrée à une présentation du genre Morchella et à une synthèse des travaux dont il a fait l'objet.

La morille est un discomycète operculé observé sur tous les continents, mais exclusivement dans les régions tempérées ou en altitude. Sauf exceptions rarement signalées, ce macromycète fructifie au premier printemps. Sa phase haploïde est jusqu'à présent considérée comme strictement saprophyte. Elle se prolonge dans les ascocarpes jusqu'au contact de l'hyménium, sous lequel survient seulement la formation des dicaryons, suivie presque immédiatement de la fusion nucléaire puis de la méiose.

On peut schématiquement classer l'ensemble des travaux réalisés sur la morille en deux catégories. La première regroupe des recherches pour la plupart anciennes et menées dans une optique générale. Ce sont ces travaux qui ont permis de discuter puis d'affirmer le caractère saprophyte du champignon, de mettre en évidence son stade conidien et son aptitude à former des sclérotites, et même d'aboutir à l'obtention occasionnelle de fructifications parfaites. La seconde regroupe des travaux plus récents et moins ambitieux puisqu'exclusivement focalisés sur l'étude des facteurs assurant la meilleure croissance pondérale de cultures pures de mycélium. Ces travaux ont néanmoins révélé les faibles besoins en sels minéraux du mycélium et sa capacité à s'adapter à une grande variété de sources d'azote ou de carbone. Ils ont débouché sur la mise au point de quelques procédés de production industrielle de mycélium.

* Laboratoire de Morphologie expérimentale, Institut de Botanique, 28 rue Goethe, 67083 STRASBOURG Cedex

Il existe cependant quelques travaux plus synthétiques qui, partant du principe qu'il est nécessaire de prendre en compte la spécificité écologique des nombreuses espèces et variétés de morilles, tendent à attribuer les aléas des résultats anciens à une rigueur expérimentale insuffisante et à une mauvaise définition du matériel végétal utilisé. C'est dans cette dernière perspective que se situe le travail présenté : il a cherché en effet à accumuler le maximum de données de terrain sur une petite population de Morchella rotunda (Pers.) Boudier de la forêt rhénane, puis à étudier en laboratoire les aptitudes à la différenciation d'inoculats issus de cette population, et ce, afin de dégager une stratégie susceptible ultérieurement d'aboutir à l'obtention de fructifications parfaites.

La deuxième partie de ce mémoire expose donc les résultats des travaux menés sur le terrain. Le principal fait mis en exergue est l'existence d'un appareil souterrain organisé, directement rattaché aux ascocarpes. Cet appareil comprend :

1°) un cordon mycélien plus ou moins volumineux qui prolonge dans le sol le stipe de chaque ascocarpe jusqu'à un organe souterrain de plante supérieure, tige ou racine;

2°) un ensemble de manchons mycéliens raccordés à ces cordons et entourant localement ces organes souterrains, et, lorsqu'il s'agit de racines, les entourant à des niveaux âgés dévolus essentiellement au transport de métabolites élaborés et non à l'absorption minérale ou à la croissance;

3°) connecté à ces manchons, un réseau d'hyphes fasciculées, apparemment libre dans l'humus et comportant dans ses mailles des ilots de faux tissus sclérotiques.

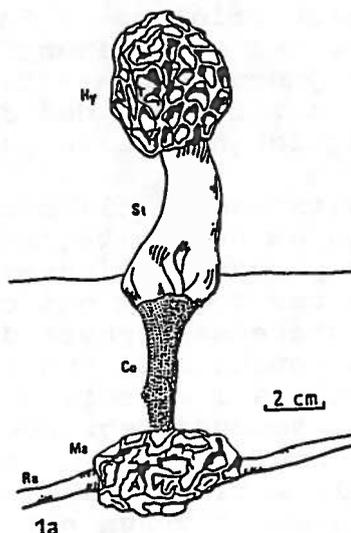


Figure 1 : Ascocarpe de Morchella rotunda (Pers.) Boudier relié à une racine de ligneux. Hy, hyménium ; St., stipe ; Co, cordon mycélien ; Ma, manchon mycélien ; Ra, racine.

PLANTES LIGNEUSES

Fraxinus excelsior L. (très fréquent)
 Ligustrum vulgare L. (très fréquent)
 Quercus robur L.
 Ulmus campestris L.
 Corylus avellana L.
 Cornus sanguinea L. (fréquent)
 Prunus fruticans L.
 Picea excelsa L. (vu une fois)

PLANTES HERBACÉES

Allium ursinum L. (bulbe et racines principales)
 Taraxacum sp. (vu une fois)
 Eupatorium cadabinum L. (vu une fois)
 Equisetum hiemale L. (fréquent)
 Lathraea squamaria L. (autour de la tige souterraine)

Figure 2 : Plantes associées à des ascocarpes de morilles.

Les plantes supérieures concernées par ces relations sont des ligneux ou des herbacées pérennes variés, ce qui révèle l'éclectisme de la morille.

Un examen histocytologique de racines de ligneux ainsi associées à des ascocarpes de morille dévoile, au niveau des manchons mycéliens, la présence d'hyphes intracellulaires pénétrant jusqu'au cambium. Cependant, dans les secteurs racinaires situés distalement par rapport aux segments entourés de manchons, des hyphes sont également observées, alors qu'elles disparaissent rapidement du côté proximal. Cette présence fongique est superficielle au niveau de la zone de mise en place du suber, abondante jusqu'à l'endoderme dans la zone absorbante et généralisée à tous les tissus hormis ceux de la coiffe dans l'apex racinaire.

Ces hyphes sont exclusivement intracellulaires sauf dans la zone absorbante, où elles sont également observées dans les méats. Leurs caractères morphologiques et cytologiques les désignent comme appartenant à la morille, et cette idée est confirmée par la culture associée in vitro de jeunes troènes et de mycélium de morille. Par ce procédé, on obtient en effet un envahissement des tissus racinaires dont les images cytologiques concordent avec celles observées sur des racines contaminées prélevées in natura.

Cet ensemble de faits et d'expérimentations permet, après discussion, de reconstituer la phénoménologie de l'exemple d'association rhyzo-fongique étudié et d'en interpréter la nature :

- une première phase de cette association concerne l'édification du manchon mycélien. Elle débute vraisemblablement par une attaque initiale de mycélium aux niveaux mêmes qui porteront ensuite les manchons. Dans ces secteurs âgés et pour la plupart subérifiés, le mycélium pénètre les racines jusqu'au liber, où il puise les métabolites élaborés qui permettent dans un premier temps l'édification des manchons mycéliens, puis, ultérieurement,

celle des cordons mycéliens et de l'ascocarpe lui-même. Cette phase est à l'évidence parasite ;

- une deuxième phase concerne la colonisation progressive de toute la partie terminale de la racine. A partir du point d'impact précédent, une partie des hyphes se développe distalement en pénétrant plus ou moins profondément dans chaque secteur, selon le degré de résistance qu'il oppose. Ainsi, au moment où les ascocarps sont matures, le mycélium est encore maintenu en périphérie par les cellules vivantes du jeune suber de la zone de subérification. Dans la zone absorbante, les hyphes sont stoppées au niveau de l'endoderme. A proximité de cette assise, un équilibre éphémère et transitoire semble se créer entre les deux organismes dont l'aspect cytologique évoque, pour un temps, une relation symbiotique. Enfin, dans l'apex, l'invasion généralisée et la destruction de vastes territoires cellulaires suggèrent une possible condamnation à terme de la racine. Ici encore, cette phase est parasite.

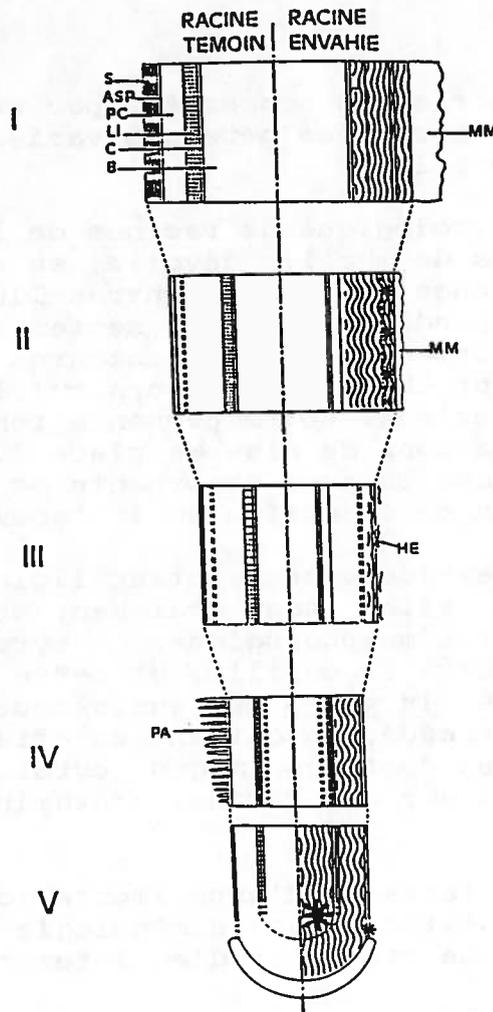


Figure 3 : Schéma représentatif des variations de la profondeur de pénétration des hyphes de morille dans les différents niveaux de racines de frêne associées à des ascocarps

S., suber ; ASP, assise subérophellodermique ; PC, parenchyme cortical ; Li, liber ; B, bois ; C, cambium ; MM, Manchon mycélien ; HE, hyphes externes ; PA, poils absorbants ; *, zones nécrosées ; {}, zones envahies par les hyphes.

La seconde partie du travail de terrain porte sur l'écophysiologie. Elle montre que le processus de fructification s'étend sur plusieurs semaines et comporte différentes phases :

- une phase d'initiation qui aboutit à la formation d'un ascocarpe miniature (4 à 10 mm) ;
- une phase d'élongation rapide, au cours de laquelle, en quelques heures, l'ascocarpe émerge de la litière et atteint les deux tiers de sa taille définitive ;
- une phase finale de maturation de durée variable durant laquelle l'ascocarpe termine son élongation puis sporule.

Cette partie du travail se clôt sur l'exposé des variations thermiques annuelles enregistrées dans la litière et le sol d'une station à morilles. Ces données suggèrent un traitement thermique possible pour tenter d'obtenir des fructifications parfaites en conditions contrôlées.

Genre ANNEE	RECHAUFFEMENT DU SOL	STADE PRE-EMERGENCE	STADE EMERGENCE	STADE DE MATURATION
84	01/3	Mi 16/4 (46)	01/5 (60)	10/5 (70)
		Mo --	15/5 (75)	26/5 (86)
85	01/3	Mi 17/4 (47)	29/4 (59)	10/5 (70)
		Mo --	8/5 (68)	15/5 (75)
86	10/3	Mj 21/4 (41)	05/5 (55)	15/5 (65)
		Mo --	08/5 (59)	20/5 (71)

Figure 4 : Délais qui séparent le début du réchauffement printanier du sol et l'avènement de chacun des trois stades de fructification dans la placette à Mitrophores (Mi) et celle à Morilles rondes (Mo) de la forêt d'Offendorf ; les données concernent les années 1984, 1985 et 1986. Les chiffres entre parenthèses représentent le nombre de jours écoulés entre le début de la phase de réchauffement du sol et la date de l'avènement de chaque stade de fructification.

La troisième partie de ce travail, réalisée en laboratoire, a pour but d'obtenir en culture pure un maximum de formes différenciées de mycélium (hyphes cutinisées, sclérotés, stade conidien) et de déterminer par la-même les facteurs favorables à ces différenciations.

Il est ainsi montré que la cutinisation du mycélium, première phase de sa différenciation, est déclenchée par la rencontre d'un obstacle matériel. Cette rencontre conditionne également la formation précoce d'une vague de petits sclérotés ponctiformes mais à tendance encroûtante. Un second type de sclérotés, plus volumineux (jusqu'à 5 mm de diamètre), se forme ultérieurement, et semble essentiellement dépendre de l'âge des cultures.

Par ailleurs, sur des cultures en milieu liquide modérément agitées, on parvient à montrer que l'aptitude à former des sclé-

rotes est plus forte au printemps et, dans une moindre mesure, à l'automne, ce qui suggère l'existence d'un rythme biologique annuel.

L'étude de l'influence de plusieurs milieux nutritifs sur l'aptitude du mycélium à se différencier ensuite abordée. L'un des milieux testés, habituellement utilisé pour la culture in vitro de plantes supérieures (le milieu N 30 K de Margara) et essayé ici en préalable aux cultures associées, provoque un développement remarquable. En effet, le mycélium qui s'y développe est formé d'hyphes hyperramifiées et possède une très faible vitesse de colonisation du milieu. De plus, les articles mis en place à la marge de tels thalles sont capables de produire des conidies qui peuvent germer sur place ou après abscission. Ces productions diffèrent cependant notablement des appareils conidiens habituellement décrits sur la morille.

Parmi les autres milieux nutritifs testés, les milieux semi définis riches en extraits de levure et de malt et, dans une moindre mesure, le milieu de Knop provoquent sur les cultures la formation de secteurs non contagieux. Ces secteurs séparent entre elles des portions de thalle, dont les caractéristiques morphologiques diffèrent et qu'après discussion, il a été possible de ramener à deux types :

- d'une part un type dont les hyphes à nombreuses ramifications aériennes sont incapables de former des sclérotés encroûtants à l'issue de la colonisation des surfaces de cultures ;
- d'autre part un type dont les hyphes restent prostrées sur la gélose et produisent des sclérotés encroûtants dès la fin de la colonisation du milieu.

Les expérimentations suivantes analysent en détail ce phénomène de sectorisation et tentent d'en interpréter le sens. Ainsi, par des expériences de suppression ou de remplacement de sources de carbone ou d'azote, on parvient à montrer que la cutinisation, la formation de sclérotés et surtout la sectorisation sont dépendantes de l'apport azoté, alors que l'apport carboné, pourvu qu'il se situe hors des limites de la carence, ne possède pas d'influence sur ces phénomènes de différenciation.

Par ailleurs, des cultures monospermes de mycélium ne produisent aucune sectorisation mais confirment l'existence des deux classes de mycélium déjà décrites. Cependant, par bouturage et culture prolongée de ces souches monosporales, on montre que, sur les milieux et dans les conditions testées, toute aptitude à former des sclérotés encroûtants ou non se perd rapidement. Ces cultures prolongées soulignent donc la rapide perte des capacités morphogènes du mycélium de morille lorsqu'il est cultivé sur un milieu trop simplifié.

La dernière partie du travail est consacrée à une discussion sur la place des sclérotés dans le cycle biologique des morilles. Cette discussion se fonde en particulier sur l'influence de

différents traitements thermiques sur la formation des sclérotés. Ainsi, il s'avère que sur des cultures en conditions contrôlées, une élévation de la température au-dessus de 20°C favorise la prolifération des sclérotés. A l'inverse, seuls des thalles possédant de volumineux sclérotés initiés sur des milieux nutritifs riches sont capables de redémarrer à l'issue d'un traitement au froid à -10°C.

Par ailleurs, la recherche par chromatographie en HPLC des mycosporines, molécules caractéristiques des spores et des carpophores, permet de souligner le caractère potentiellement reproductif des sclérotés encroûtants. En effet, ces expériences montrent que la morille contient deux couples de mycosporines, d'une part la mycosporine glutamine en équilibre avec la mycosporine acide glutamique, d'autre part un couple non encore identifié, à temps d'éluion plus long, et qui pourrait être un des précurseurs du couple de mycosporines précédent. Toutes ces mycosporines sont très abondantes dans les hyméniums analysés, mais en revanche, elles sont absentes dans le mycélium pur. On les retrouve en quantité faible dans les organes souterrains des ascocarpes et chez les sclérotés encroûtants obtenus en culture, ainsi qu'en quantité intermédiaire dans les stipes. Les faits présentés dans cette dernière partie suggèrent que chez la morille, les sclérotés peuvent être interprétés comme des formes qui, parallèlement à une fonction de survie et d'accumulation de réserves, possèdent la capacité de fructifier.

La conclusion de ce mémoire fait la synthèse des observations de terrain et des résultats acquis en laboratoire. Elle suggère ensuite quelques axes de recherches pour une phase ultérieure :

- tout d'abord, elle propose un programme de travaux destinés à permettre l'obtention de fructifications parfaites en conditions contrôlées. Ce programme tient compte des connaissances écophysiologicalues acquises, du caractère parasite de la morille, de son rythme biologique et du rôle des sclérotés ;

- mais des perspectives plus fondamentales sont également évoquées. Ainsi, l'intérêt de la morille comme modèle d'étude des mycosporines et de leur biosynthèse, le rythme biologique dans la formation des sclérotés, qui pourrait être précisé grâce à des dosages périodiques du taux des différentes mycosporines et enfin l'étude plus fine de l'association entre les ascocarpes de morilles et les organes souterrains de plantes supérieures.