

Truffe en quête de pères : un champignon à l'orientation sexuelle forcée, et pas encore domestiqué !

Marc-André Selosse¹, Elisa Taschen², Mathieu Sauve²,
Laure Schneider-Maunoury¹, François Rousset³, Franck Richard²

Le programme SYSTRUF paraît déjà appartenir au passé (le rendez-vous du Pont du Gard, en octobre 2013, est déjà si loin !) mais les résultats sortent encore : il faut comprendre les temps d'analyse, parfois fort longs, nécessaires à une interprétation sérieuse et mesurée des données... Le volet génétique et sexuel vient de connaître une nouvelle étape avec un article tout juste publié dans *Molecular Ecology* [1] par nos équipes : il précise la sexualité de la truffe, mais aussi l'effet des pratiques de plantation sur la diversité génétique et la reproduction de *Tuber melanosporum*. Nous tentons de présenter ici les résultats en termes simples, replacés dans le contexte général des connaissances actuelles.

Une reproduction pas claire. La figure 1 montre nos connaissances et nos hésitations actuelles sur le cycle de la truffe (voir la mise au point « Certitudes et incertitudes sur le cycle du genre *Tuber* » de F. Le Tacon, *Le Trufficulteur* n° 78, en 2012). L'organe que nous ramassons est le produit

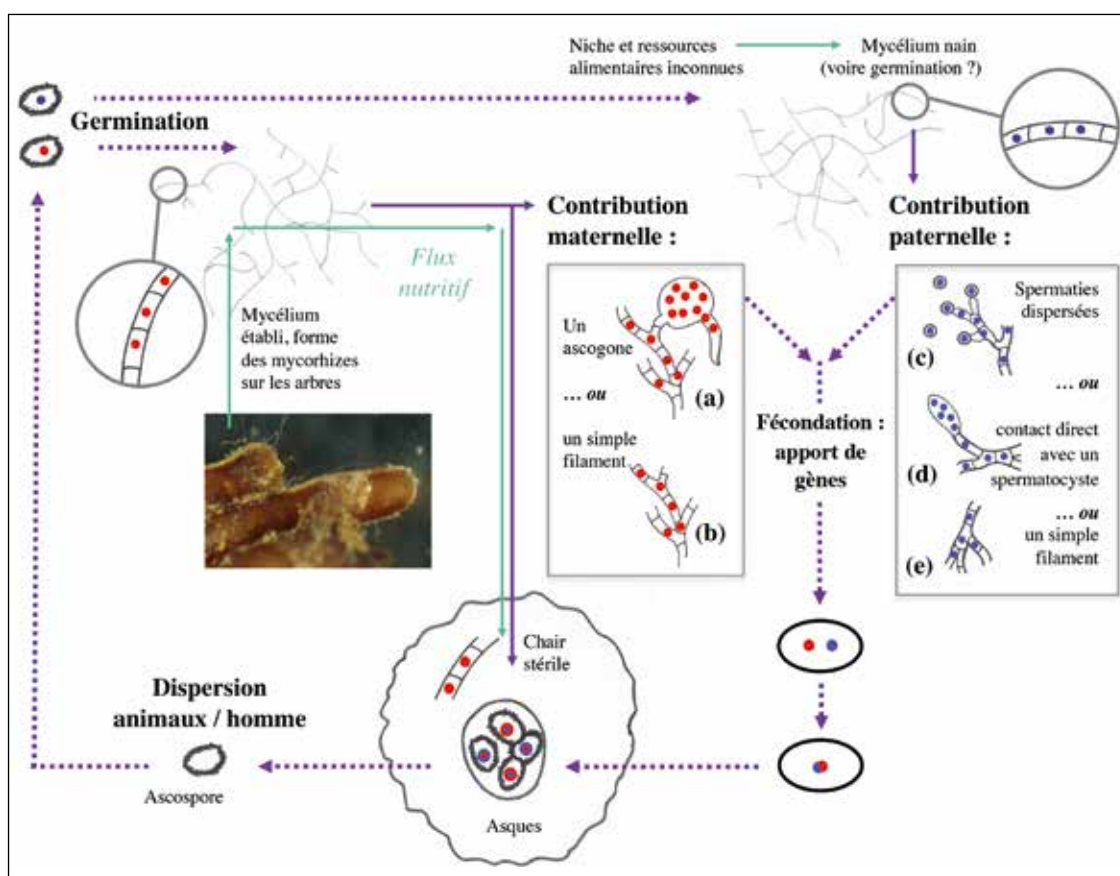


Figure 1 : Le cycle de *Tuber melanosporum* (flèches en violet) et la fécondation. L'image indique les ressources nutritives (flux en vert) qui nourrissent les individus, connues pour les femelles mais encore inconnues pour les mâles. Les deux couleurs de noyau (rouge et bleu) représentent les types sexuels différents. Pour la fécondation, on représente les interactions possibles, vues les connaissances acquises sur les parents de la truffe, entre l'individu femelle (qui donne la chair de la truffe) et l'individu mâle (qui mélange ses gènes avec ceux de l'individu femelle pour engendrer les spores) : du côté femelle, la partie réceptive peut être une structure élaborée, l'ascogone (a), ou un simple filament du mycélium (b), et cela ne change guère au résultat. Du côté mâle, l'élément fécondant peut être une cellule qui se détache (une spermatie, c), une structure spécialisée non détachable (d) ou encore un simple filament du mycélium (e). Le type de structure mâle joue sur la dispersion des gènes du mâle : elle est nulle si la partie fécondante est liée à l'individu (cas d et e), mais dans le cas où la cellule est détachable (c) le mâle pourrait alors féconder à distance. Or, nous n'avons rien trouvé, dans nos travaux, qui démontre une telle dispersion à distance. S'il y a des spermaties (elles n'ont pas été observées à ce jour chez *T. melanosporum* malgré nos efforts), elles ne sont pas dispersées. En revanche, nos travaux suggèrent que les individus qui jouent les rôles mâle et femelle ont des tailles, des diversités et des survies très différentes (voir texte).

¹ Muséum national d'Histoire naturelle.

² Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Montpellier.

³ Institut des Sciences de l'Evolution, Montpellier.

de la fécondation entre deux individus : l'un, qu'on appelle la mère, ou individu femelle, forme la chair blanche et stérile de la truffe, et il est aussi connecté aux racines des arbres voisins. Bien qu'on n'ait jamais vu ce lien, sans doute microscopique, les équipes de l'INRA de Nancy l'ont clairement démontré par le flux de carbone qui va de la photosynthèse de l'arbre à la truffe [2]. Mais les spores, elles, montrent qu'il existe un second parent, plus énigmatique : le père, ou individu mâle, qui mélange ses gènes à ceux de la mère pour former les spores. Il donne donc ses gènes dans la production des descendants.

Bien que la truffe soit potentiellement capable d'être mâle et femelle, il existe deux types d'individus : les MAT1-1 et les MAT1-2-1 (on parle de deux types sexuels). Ce mécanisme empêche un individu de se féconder lui-même car la fécondation ne peut avoir lieu qu'entre individus de type sexuel différent. Un individu d'un type sexuel ne peut être fécondé que par un individu de l'autre type. Cela n'a rien à voir avec le rôle sexuel : il pourra jouer un rôle de mâle, ou de femelle, voire même les deux si la fécondation est réciproque. Pour en savoir plus, voyez l'encadré !

Mais comment le père vient-il féconder la mère, comment les partenaires se retrouvent-ils ? Ce qu'on sait des champignons proches de la truffe dans l'Évolution laisse imaginer deux mécanismes : soit une interaction physique directe entre le père et la mère dans le sol, d'un mycélium à l'autre par contact, soit une interaction à distance si le père produit des petites cellules dispersées par le vent ou les animaux. Les mécanismes possibles sont récapitulés sur la figure 1.

La suite est connue : des animaux mangent les truffes, et les spores contenues sont déposées intactes dans les crottes. Parfois, l'homme récolte la truffe et, s'il ne la

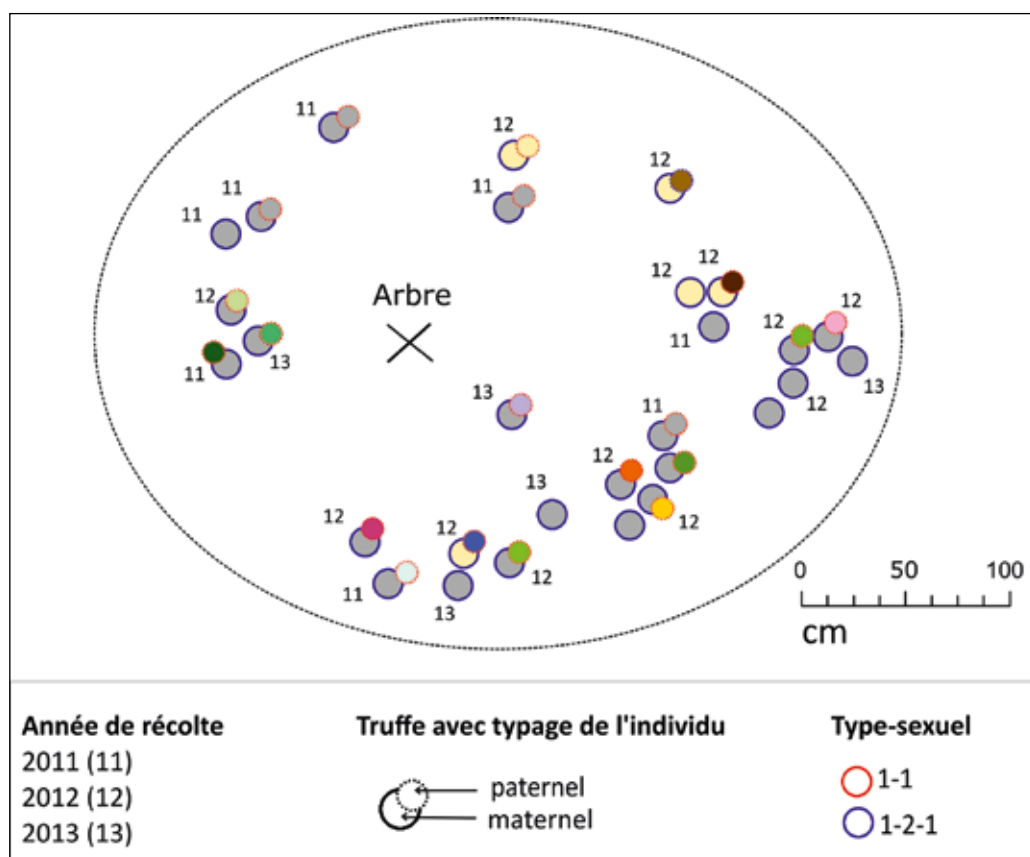


Figure 2 : Cartographie et identification génétique des truffes produites sur un brûlé (de plantation, en ce cas) durant trois années (2010-2012). Nous avons analysé cinq brûlés similaires. Chaque point correspond à une truffe récoltée pour laquelle l'individu maternel correspond au grand cercle et l'individu paternel correspond au cercle plus petit en surimpression de la femelle. Les différents individus (ou génotypes) se distinguent par des coloris différents, et le type sexuel de chacun de chaque individu est indiqué par le contour du cercle, rouge ou bleu. On voit qu'il n'y a que deux femelles de grande taille, mais de nombreux (8) mâles.

mange pas, il peut l'utiliser pour des inoculations en pépinière. Car c'est la nouveauté : il existe depuis quelques siècles des arbres inoculés et plantés par l'homme, qui contribuent à la dispersion de la truffe. Cela permet quand même la reproduction et la propagation du champignon ! En ce sens, nous sommes manipulés par la truffe, qui nous utilise pour se propager et se reproduire !

Cinq ans de travail. Nous avons voulu en savoir plus sur les parents, leurs liens physiques et leur proximité génétique. Nous avons aussi voulu savoir l'impact des plantations d'arbres inoculés qui totalisent maintenant 80% de la production nationale. Et pour cela, dans un travail inscrit dans la région Languedoc-Roussillon qui a en partie aidé à le financer, nous avons

travaillé sur plus de... 950 échantillons, collectés sur 5 ans !

Cela n'aurait pas été possible sans tous ceux qui nous ont aidé : la Fondation de France qui a cofinancé la thèse d'Elisa Taschen, ceux qui nous ont donné une truffe, toute la production d'un brûlé, des morceaux de toute la production d'une parcelle, et nos collègues de Nancy qui ont mis à notre disposition, à titre de comparaison, des données de la plantation de Rollainville. On ne le dira jamais assez de SYSTRUF : le travail n'aurait jamais été possible sans tous les trufficulteurs qui nous ont accueillis, conseillés et, au fond, sponsorisés de leur temps et de leurs échantillons. SYSTRUF illustre la force du collectif sur le projet individuel, et on ne peut qu'espérer que le tissu formé

persistera ! MERCI à tous ceux qui ont répondu à nos sollicitations.

L'essentiel de notre travail est fondé sur l'identification génétique des individus, sur les racines d'arbres, la chair de la truffe (la mère) et les spores (issues de la fécondation entre la mère et le père). Nous utilisons d'une part la détection du type sexuel, et d'autre part des fragments d'ADN, les microsatellites. Ces parties du génome de la truffe (nous en utilisons 14) sont très variables et elles permettent de différencier les individus entre eux : c'est ce qu'utilise d'ailleurs la police scientifique chez l'homme, pour reconnaître les criminels.

Sexualité et vie... en famille. En comparant le père et la mère, nous avons confirmé une tendance décrite chez

d'autres truffes (la truffe d'été et la truffe blanche) et chez la truffe noire par d'autres travaux [3] : le père et la mère sont génétiquement très proches. Ils sont presque identiques, voire même complètement identiques (pour les 14 microsatellites) dans environ 30% des cas (ils se différenciant alors uniquement par leur type sexuel). On peut dire qu'il existe une très forte consanguinité chez la truffe.

Par ailleurs, quand on compare des mères voisines sur un brûlé ou une truffière, ou encore les mycorhizes des arbres, on trouve des individus génétiquement proches. D'abord, nous avons confirmé que les individus voisins ont souvent le même type sexuel : ce résultat déjà connu [4] a été retrouvé dans toutes nos parcelles. Cette agrégation entre individus de même type sexuel pose un problème pour la fécondation sur lequel nous reviendrons, car un individu risque de manquer de voisins compatibles pour former une truffe ! Mais bien plus, pour toutes les autres parties du génome étudiées par microsatellites, plus les individus sont proches dans la truffière, plus ils sont proches génétiquement.

On ne sait pas encore pourquoi de telles tendances à la réunion d'individus proches se manifestent : on pense que, peut-être, des gènes liés au type sexuel entraînent une coopération entre individus génétiquement proches (et donc de même type sexuel), qui s'entre-renforcent ainsi entre eux, excluant les autres [5]. Nos travaux montrent aussi que ce regroupement spatial entre individus proches génétiquement et par le type sexuel est vrai en plantation comme en truffière spontanée, et n'est pas un « accident » de plantation.

Quelques mères pour de nombreux pères cachés. Les individus maternels (qui forment la chair des truffes) sont grands et souvent persistants d'année en année (figure

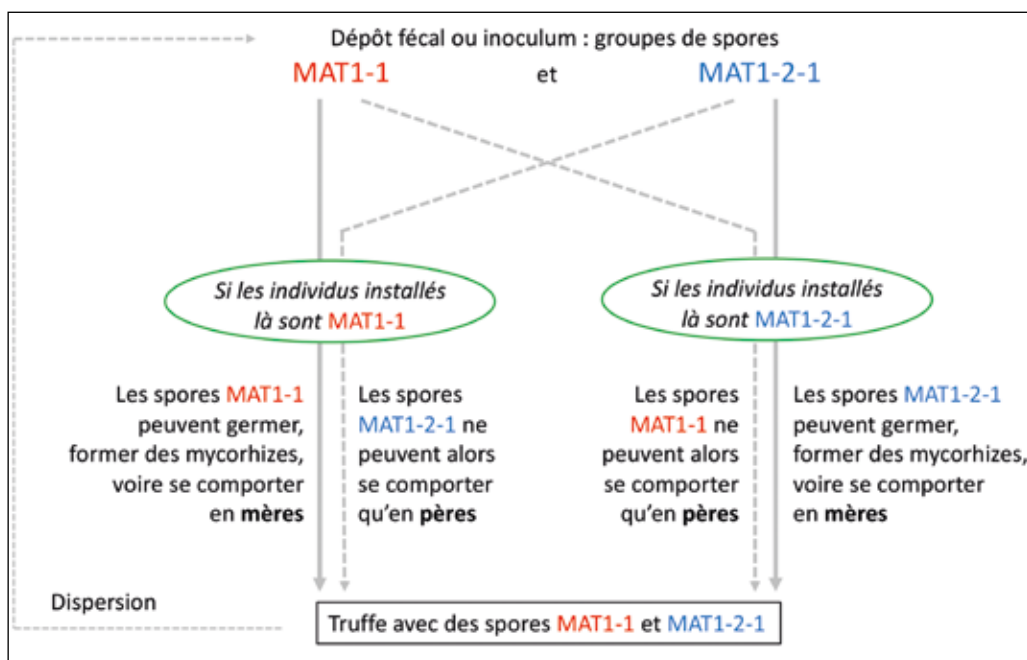


Figure 3 : Orientation sexuelle forcée par l'environnement chez *Tuber melanosporum*. Bien que la truffe soit potentiellement hermaphrodite, son rôle dans la fécondation, mâle ou femelle, est déterminé par l'environnement où elle se trouve, c'est-à-dire le type sexuel qui domine dans le sol localement. Selon que le type sexuel d'une spore correspond, ou non, à ce type dominant, elle pourra après germination être, respectivement, femelle ou mâle.

2). Comme d'autres équipes [4], nous avons retrouvé les mêmes mères plusieurs années de suite sur le brûlé (jusqu'à 4 ans), et certaines forment plusieurs truffes voisines, suggérant que ces individus peuvent atteindre des tailles de l'ordre du mètre, voir jusqu'à 10 mètres pour certains individus en truffière spontanée ! Lorsque nous avons analysé les mycorhizes voisines des fructifications, nous avons retrouvé là aussi, installés sur les arbres, les individus maternels. Les pères, quant à eux, sont plus petits (on les trouve sur

de moins grandes surfaces), souvent observés dans une seule truffe (figure 2), rarement retrouvés d'une année sur l'autre (à une exception près), et on ne les trouve pas sur les mycorhizes des arbres voisins. En fait, au niveau des mycorhizes, on observe aussi un regroupement spatial entre individus identiques par le type sexuel, et l'absence des pères, qui ont le type sexuel opposé, est donc logique. Mais cette absence près des mères est étrange, et nous y reviendrons. Enfin, nous n'avons jamais trouvé un père qui soit, par ail-

leurs, une mère. Il arrive, mais très rarement, qu'une mère et un père soient identiques génétiquement : à chaque fois, cela correspond à des types génétiques « banals », c'est-à-dire qui ont une forte probabilité d'être observés (comme un blond aux yeux bleus à Lille par exemple !), et la ressemblance ne veut donc pas dire que c'est le même individu. Donc, nous n'avons observé aucune preuve crédible d'individu effectivement mâle et femelle.

Nos travaux ont révélé deux différences notables entre plantation et truffière sponta-

LABORATOIRE Teyssier
 ANALYSES AGRICOLES

Plantation et suivi de truffières

ANALYSER
 INTERPRÉTER
 CONSEILLER

Nos analyses et conseils seront pour vous de vrais outils d'aide à la décision.

LABORATOIRE TEYSSIER - Route des Junchas - 26460 BOURDEAUX - Tél. 04 75 53 31 43 - info@laboratoire-teyssier.com - www.laboratoire-teyssier.com

née. En plantation, les individus maternels sont chacun plus productifs (ils forment un plus grand nombre de truffes par individu). Un ou deux individus dominants sur le brûlé peuvent représenter jusqu'à 90 % de la production du brûlé. De plus, les pères sont plus nombreux et plus divers ! Dans notre étude, il y a environ une femelle pour un mâle dans les brûlés de truffières spontanées mais une femelle pour 4 mâles dans ceux plantés ! Nous reviendrons plus loin sur des explications potentielles.

Il n'y a pas encore de « truffe domestiquée ». Nos analyses génétiques sur le Languedoc-Roussillon montrent que la diversité génétique est aussi importante parmi les truffières plantées que parmi les truffières sauvages.

Bien plus : cette diversité génétique est la même, il n'y a aucune particularité propre aux truffes de plantation ou à celles de truffières sauvages. Il y a donc des échanges génétiques importants entre ces milieux. L'utilisation de truffes sauvages pour inoculer les arbres, les déplacements de spores par les animaux, etc. rendent sans doute encore poreuse la limite génétique entre truffes « sauvages », et truffes de plantation inoculée, en Languedoc-Roussillon au moins.

Nous avons trouvé la trace d'une faible variabilité géographique de la diversité génétique en Languedoc-Roussillon, confirmant d'autres études qui montrent des différences génétiques à grande échelle [3,6]. Cette différenciation est surtout visible dans

les plantations, et moins soutenue statistiquement dans les truffières spontanées. Cela veut dire qu'à ce jour, les échanges commerciaux de plants inoculés n'ont pas effacé les particularités locales, sans doute parce qu'une grande fraction des plants est inoculée avec des truffes locales dans cette région. Mais cela suggère qu'il ne faudrait pas trop mélanger les provenances des arbres inoculés si l'on veut, à l'avenir, garder des caractéristiques génétiques locales. Il faut souligner toutefois que rien dans nos travaux n'indique une contribution de cette diversité géographique à la qualité ou à l'adaptation à des conditions de sol ou de climat local : cette question-là reste ouverte, nous ne l'avons pas étudiée.

Un scénario pour la repro-

duction de la truffe. Nos résultats et ceux obtenus par d'autres équipes commencent à cerner la reproduction de la truffe. En voilà une esquisse, qui inclue nos observations. (voir figure 3)

Les apports spontanés se font par les fèces d'animaux. Les spores déposées sont génétiquement proches entre elles : elles proviennent d'un nombre limité de truffes et dans chacune, en plus, les parents – et donc les spores – sont très proches génétiquement ! Ici s'enclenche un mécanisme mal connu, qui sélectionne les individus de même type sexuel [4,5], mais aussi sans doute les individus proches génétiquement : il explique la structure observée, où les individus proches physiquement sont proches génétiquement. Ceci explique

Type sexuel, mâle/femelle, père/mère... ? Une clarification s'impose !

Il faut retenir que les types sexuels ne déterminent pas les structures qui permettent la fécondation et qui entament la mise en place de la truffe qu'on ramasse. Chacun des deux types sexuels a la capacité de développer des structures mâles et femelles (du type de celles illustrées dans la figure 1), et ainsi être père ou mère.

Type sexuel - chez les champignons, la fécondation est orchestrée par les gènes du type sexuel. Pour les Ascomycètes (dont *Tuber melanosporum* fait partie), il existe deux versions alternatives de ce gène (les types MAT1-1 et MAT1-2-1 chez *T. melanosporum*). Ils sont impliqués dans la reconnaissance entre les individus de types sexuels opposés lors la fécondation (par un système de phéromones). Les mycéliums portant des versions différentes de ce gène sont inter-fertiles, car ils peuvent se reconnaître et s'accoupler ; mais un individu ne peut pas s'autoféconder car il a le même type que lui-même !

Mâle et femelle - chez certains Ascomycètes existe en plus une différenciation sexuelle, avec des structures différentes liées à la fécondation (figure 1). Le produit de la fécondation (le zygote, qui donne ensuite les spores) se développe alors sur un partenaire dont la contribution, importante d'un point de vue nutritif, est dit femelle par convention. L'autre partenaire donne seulement ses gènes : c'est par convention le mâle. Il faut noter que les types sexuels n'ont rien à voir avec ces deux fonctions : ils se superposent à la différenciation sexuelle. Un individu MAT1-1 peut servir de mâle dans un croisement avec un individu MAT1-2-1 qui jouera un rôle de femelle à ce moment-là ; il peut aussi servir de femelle dans un croisement avec un individu MAT1-2-1 qui jouera un rôle mâle à cet autre moment.

Ainsi, les truffes et de nombreux autres Ascomycètes sont des hermaphrodites qui produisent des parties mâles et femelles à la fois, mais l'existence de types sexuels interdit l'autofécondation. C'est un peu la même chose que chez les escargots qui (eux pour des raisons anatomiques) ne peuvent s'autoféconder alors qu'ils sont hermaphrodites. Mais ce que nous montrons chez *T. melanosporum*, c'est que les circonstances (= le type sexuel qui est localement dominant) obligent les individus à fonctionner soit en mâle, soit en femelle, même s'ils sont théoriquement capables des deux fonctions.

Une conséquence importante dont il faut se souvenir : les ascocarpes contiennent un mélange de spores MAT1-1 et de spores MAT1-2-1, puisque le père et la mère ont chacun introduit un type sexuel différent. Donc, quand on inocule une truffe, ou quand des déjections animales déposent des spores, les deux types sont introduits en même temps – et ils y persistent car les spores peuvent sans doute survivre plusieurs années dans le sol.

aussi que cette structure soit aussi présente sur des brûlés de plantation, où l'inoculation est variable selon la provenance des arbres (mais pas toujours limitée à une seule truffe). Si un mécanisme secondaire « filtre » des individus proches sur le brûlé, alors il est logique qu'on observe partout la même structure génétique, que l'inoculum de départ soit spontané ou de main d'homme.

Arrive le moment de la reproduction. Le père est génétiquement proche : il vient donc d'à côté, car s'il venait de plus loin on n'expliquerait pas la consanguinité observée ! Au passage, cela veut dire que le scénario où le mâle émet des cellules sexuelles à distance (figure 1, cas «c») n'est pas soutenu : soit ces cellules n'existent pas, soit elles restent à proximité du mâle. Mais justement, à côté de la femelle, il n'y a la plupart du temps que des partenaires de même type sexuel... Comment résoudre ce paradoxe ? Il ne faut pas oublier qu'il y a dans le sol de nombreuses spores de l'autre type sexuel, génétiquement proches des femelles installées : ce sont des spores arrivées auparavant, avec celles qui ont donné ces femelles, ou des spores issues de truffes non détectées et restées en terre, et qui descendent donc des femelles installées. Nous pensons que la germination de ces spores dans le sol est une source possible de mâles [5] ! Cela résout le problème d'un père proche physiquement et génétiquement. Ce qui est moins clair, c'est de savoir si ces mâles survivent un peu, et si oui, où ils s'installent, car nous ne les avons pas trouvés sur les racines. Peut-être ne vivent-ils que le temps d'une germination et d'un accouplement avec les individus bien installés ?

Ainsi, l'orientation sexuelle des individus, bien que chacun soit capable d'être mâle et femelle, est-elle forcée par l'environnement (figure 3). Imaginez que vous êtes

une spore dans le sol : soit vous avez le type sexuel localement dominant, alors vous pourrez vous installer, peut-être aidé par vos voisins (un mécanisme qui n'est pas bien connu à l'heure actuelle). Bien sûr, rien ne garantit cela : toutes les places sur les racines seront peut-être prises à ce moment-là ; peut-être germerez-vous en vain. Soit, vous avez le type sexuel localement absent, au moins sur les mycorhizes des arbres. Alors vous ne vous installerez pas sur les racines des arbres, mais, en germant (et peut-être en survivant un peu, mais on ne sait comment, et guère plus qu'une année) vous pourrez peut-être avoir des descendants en fécondant l'une des femelles voisines déjà installées.

Nos résultats n'excluent pas qu'un individu femelle puisse être aussi mâle : mais la plupart du temps, il manque de voisin femelle de type sexuel compatible, car il est au voisinage d'individus de même type sexuel. Cependant, un individu en limite d'un secteur peuplé d'individus de l'autre type peut être femelle et mâle. La plupart du temps néanmoins, l'environnement, c'est-à-dire le type sexuel localement dominant, contraint l'individu à être mâle ou femelle !

Les plantations n'ont guère modifié la truffe. Notre approche comparative de truffières spontanées et plantées montre que le scénario précédant s'applique partout. À un détail près : la découverte que les mâles sont plus nombreux et diversifiés en plantation. Nous pensons que les déplacements de spores liés aux activités de gestion, souvent plus nombreuses et interventionnistes en plantation, expliquent cela : en particulier, les apports volontaires de fragments de truffe en fin de saison peuvent expliquer cette observation. Selon notre scénario, ces interventions, qui augmentent la diversité des spores, peuvent augmenter la diversité des pères disponibles. Nous entreprenons actuellement de tester cela, mais rien n'indique encore, en l'état actuel de nos données, que ces apports soient nécessaires (il existe peut-être une banque de spores suffisante dans le sol truffier), ni qu'une diversité accrue des pères améliore la production : c'est encore chose à tester !

Pour terminer, nos travaux laissent encore bien des questions ouvertes : nous n'avons travaillé que dans une région, et même si nous pensons que ces résultats sont généraux, il convient de répéter l'opération. Notamment dans des ré-

gions où les plantations sont très nombreuses, comme dans certaines régions espagnoles, observera-t-on aussi un effet limité des techniques de trufficulture sur la diversité génétique de la truffe ?

Enfin, même si nos travaux renseignent sur les caractéristiques des mâles, celles-ci restent à préciser et leur niche écologique exacte reste à découvrir. De même, les modalités exactes de la fécondation, dans la jeune truffe ou juste avant sa mise en place, restent à observer... Ainsi, la recherche du père n'est-elle pas terminée, et les secrets d'alcôves de la truffe ne sont-ils pas encore percés !

Références (les articles 1 et 5 sont en ligne sur <http://isyeb.mnhn.fr/Articles-de-recherche>) :

- [1] Taschen et al., 2016, *Molecular Ecology*, sous presse (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/mec.13864/full>)
- [2] Le Tacon et al., 2013, *PLoS ONE*, 8, e64626.
- [3] Riccioni et al., 2008, *New Phytologist*, 180, 466.
- [4] Rubini et al., 2011, *New Phytologist*, 189, 723; Murat et al., 2013, *New Phytologist*, 199, 176.
- [5] Selosse et al., 2013, *New Phytologist*, 199, 10.
- [6] Murat et al., 2004, *New Phytologist*, 164, 401.



AGRI-TRUFFE
LIGENCE INRA
Depuis 1972

Parce que votre réussite est la nôtre.

Toute l'expertise de notre équipe est consacrée à parfaire la qualité d'un seul produit : le plant truffier mycorhizé selon le procédé INRA, sous licence et contrôle INRA.

AGRI-TRUFFE
33490 SAINT-MAIXANT - FRANCE
TEL : 05 56 62 09 62 - FAX : 05 56 62 09 63
e-mail : pepiniere@agriftruffe.eu

<http://www.agriftruffe.eu>