Etude de biodiversité microbiologique forestière : variations annuelles et spatiales de la structuration génétique d'espèces choisies de champignons ectomycorhiziens

Anne-Marie Fiore-Donno

▶ **To cite this version:**

Anne-Marie Fiore-Donno. Etude de biodiversité microbiologique forestière : variations annuelles et spatiales de la structuration génétique d'espèces choisies de champignons ectomycorhiziens. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Henri Poincaré (Nancy 1); Université de Lausanne, 2001. Français. NNT : . tel-02833078

HAL Id: tel-02833078
https://hal.inrae.fr/tel-02833078

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document numérisé est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.
Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur au même titre que sa version papier. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.
D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.
La Bibliothèque a pris soin d'adresser un courrier à l'auteur dans lequel elle l'informe de la mise en ligne de son travail. Celui-ci peut en suspendre la diffusion en prenant contact avec notre service.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LAUSANNE
FACULTÉ DES SCIENCES

Institut d'Ecologie

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ NANCY 1
FACULTE DES SCIENCES

U.F.R. Sciences et techniques biologiques
Ecole Doctorale Ressources
Procédés Produits Environnement
Département de Formation Doctorale
Biologie - Agronomie - Environnement
Secteur Biologie Forestière

Thèse en cotutelle

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I
et de l'Université de Lausanne

en Biologie forestière

par **Anne-Marie FIORE-DONNO**

Etude de biodiversité microbiologique forestière : variations annuelles et spatiales de la structuration génétique d'espèces choisies de champignons ectomycorhiziens.

Soutenue le 14 novembre 2001 à Nancy

Membres du jury :

Président :	M. Jean-Marc FAVRE	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	M. Jean-Claude DEBAUD	Professeur, Université Lyon I
	Mme Nicole GALLAND	Professeur, Université de Lausanne
Examinateurs :	M. Francis MARTIN	Directeur de recherches, INRA-UHP, Nancy
	M. Heinz CLEMENCON	Professeur, Université de Lausanne
	Mme Béatrice SENN-IRLET	Docteur, Université de Berne et WSL, Birmensdorf

INRA

UMR 1136 INRA-UHP, "Interactions Arbres/Micro-Organismes
Centre INRA de Nancy, F - 54289 Champenoux

BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

TABLE DES MATIERES

1 TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX 3

2 RÉSUMÉ 5

3 OBJECTIFS 7

4 PLAN 9

5 INTRODUCTION 10

5.1 La symbiose ectomycorhizienne dans les écosystèmes forestiers 10

5.1.1 Cycle biologique des Basidiomycètes 10

5.1.2 Structure de la mycorhize 12

5.1.3 Etablissement de la mycorhize 17

5.1.4 Durée de vie de la mycorhize et du mycélium extraracinaire 19

5.1.5 Aspects nutritionnels 20

5.1.6 Stratification verticale 21

5.2 Diversité des champignons mycorhiziens 21

5.2.1 Principaux facteurs influant sur la diversité des communautés mycorhiziennes 22

5.2.2 Répartition en fonction des formations végétales 24

5.2.3 Caractéristiques biologiques et génétiques des champignons 27

5.2.3.1 Reproduction et établissement du mycélium 27

5.2.3.2 Taille de la population 28

5.2.3.3 Croissance et fragmentation du mycélium 30

5.2.3.4 Variations physiologiques 31

5.2.3.5 Interactions entre champignons 32

5.2.3.6 Interactions avec les autres organismes du sol 33

5.2.4 Facteurs environnementaux 35

5.2.4.1 Coupe rase 35

5.2.4.2 Feu 35

5.2.4.3 Submersion 35

5.2.4.4 Type de sol et d'humus, effet du champignon sur le sol 36

5.2.4.5 Effets anthropiques, pollution atmosphérique 37

5.3 Succession des communautés mycorhiziennes 39

5.3.1 Evolution en fonction de la maturation du peuplement végétal 39

5.3.2 Modèles reliant la succession d'espèces à des caractères fonctionnels des mycélia 42

5.3.3 Modèles reliant les structures génétiques des communautés ectomycorhiziennes aux écosystèmes et à leur évolution. 45

5.4 Génétique des populations ectomycorhiziennes 47

5.4.1 Comment définir les limites "individuelles" du mycélium ? 47

5.4.2 Revue des études existantes 51

6 MATÉRIEL ET MÉTHODES 63

6.1 Identification et écologie des espèces fongiques étudiées 63

6.1.1 *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* 63

6.1.2 *Laccaria amethystina* 66

6.2 Parcelles d'étude 68

6.3 Récoltes 71

6.4 Méthodes moléculaires 73

6.5 Traitement des données 74

7 RÉSULTATS 77

7.1 Structure génétique et distribution spatiale de *Laccaria amethystina* 77

7.2 Structure génétique et distribution spatiale de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* 87

8 DISCUSSION 91

8.1 Interprétations des résultats 91

8.2 Avantages et limites des choix méthodologiques effectués dans ce travail 93

8.2.1 Peut-on baser une étude de génétique des populations uniquement sur les sporophores récoltés ? 93

8.2.2 Approche critique des méthodes moléculaires utilisées 96

8.2.3 Pertinence de l'échantillonnage 99

8.3 Questions d'actualité en matière de populations de champignons ectomycorhiziens 100

8.3.1 Influence du milieu sur la structuration des populations ectomycorhiziennes 101

8.3.2 Influences intrinsèques, physiologiques et morphologiques sur la structuration des populations ectomycorhiziennes 103

8.3.3 Questions sur la longévité des génets du genre *Laccaria* 106

8.3.4 Apport à une stratégie ciblée de protection des champignons 108

9 CONCLUSION 110

10 LEXIQUE 113

11 BIBLIOGRAPHIE 115

12 PUBLICATIONS 132

13 REMERCIEMENTS 133

14 ANNEXE 1 135

S.C.D. - U.H.P.
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY

1 TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Cycle de Basidiomycète ____ 11

Figure 2 : Ectomycorhizes établies sur le système racinaire d'un jeune conifère ____ 13

Figure 3 : Diagramme d'une ectomycorhize montrant les tissus sous différents angles ____ 14

Figure 4 : Racine mycorhizée et non-mycorhizée de *Fagus sylvatica* ____ 15

Figure 5 : Représentation schématique des six types de rhizomorphes formés par les champignons ectomycorhiziens ____ 16

Figure 6 : Etapes de l'infection ectomycorhizienne spontanée à partir de propagules naturelles présentes dans le sol ____ 18

Figure 7: Principaux facteurs qui déterminent la diversité des communautés et populations des champignons ectomycorhiziens ____ 23

Figure 8 : Relation supposée entre la latitude (ou l'altitude), le climat, le sol, et le type de mycorhize, ainsi que le développement du mycélium végétatif associé aux mycorhizes ____ 25

Figure 9 : Relations entre les conditions environnementales, le type de mycorhize, et la richesse des plantes et des champignons ____ 26

Figure 10 : Succession fongiques en fonction de l'âge de la forêt ____ 42

Figure 11 : Les différents types de colonies mycéliennes selon OGAWA ____ 45

Figure 12 : Evolution schématique d'une population de *Suillus bovinus* avec l'âge du peuplement forestier ____ 46

Figure 13 : Structuration spatiale des populations d'*Amanita muscaria* dans la plantation de *Pinus radiata* de *Jenolan Caves* dans le New South Wales, Australie ____ 54

Figure 14 : Structuration spatiale des populations de *Suillus pungens*, dans une pinède de Point Reyes, en Californie ____ 55

Figure 15 : Structuration spatiale des populations de *Laccaria amethystina* dans la hêtraie d'Aubure, dans les Vosges ____ 57

Figure 16 : Structuration spatiale des populations de *Cortinarius rotundisporus* dans trois sites d'une forêt sclérophylle dans le New South Wales, en Australie ____ 58

Figure 17 : Structuration spatiale des populations de *Hebeloma cylindrosporum* dans les Landes, en milieu dunaire et dans une pinède ____ 60

Figure 18 : Photographies de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus*, prises à la réserve mycologique de La Chanéaz ____ 64

Figure 19 : Spores de *Xerocomus pruinatus* et *X. chrysenteron* agrandies (8500 x) au microscope électronique à balayage ____ 65

Figure 20 : Racines de *Fagus sylvatica* mycorhizées par *Xerocomus chrysenteron* et *Laccaria amethystina* ____ 66

Figure 21 : Sporophores de *Laccaria amethystina* ____ 67

Figure 22 : Situation de la réserve mycologique de La Chanéaz, dans le canton de Fribourg (CH), et carte de la réserve montrant l'emplacement des parcelles d'étude. ____ 69

Figure 23 : Parcelles 47 (étude de la population de *Xerocomus chrysenteron*) et 59 (étude de la population de *Laccaria amethystina*) ____ 70

Figure 24 : Récolte de *Xerocomus chrysenteron* dans la parcelle 47 ____ 71

S.C.D. - U.H.P. NANCY
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
[illegible]

Figure 25 : Phénologie de *Laccaria amethystina* et *Xerocomus chrysenteron* 72

Figure 26 : Situation des marqueurs de l'ADN ribosomal et séquence des amorces utilisées 74

Figure 27 : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Laccaria amethystina* dans la parcelle 59 de la réserve mycologique de La Chanéaz 78

Figure 28 : Gel d'électrophorèse (acrylamide) montrant les trois haplotypes IGS 1 identifiés chez *Laccaria amethystina* 79

Figure 29 : Histogramme des fréquences des 59 marqueurs RAPD identifiés dans l'analyse de *Laccaria amethystina* 80

Figure 30 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant un exemple de profils obtenus chez *Laccaria amethystina* par l'amorce RAPD 157 81

Figure 31 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant un exemple de profils obtenus chez *Laccaria amethystina* par l'amorce RAPD 174 81

Figure 32 : Histogramme des fréquences des 18'336 indices de similarité de Jaccard, calculés dans l'analyse de *Laccaria amethystina* 83

Figure 33 : (page suivante) : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Laccaria amethystina* et des génets dans la parcelle 59 de la réserve mycologique de La Chanéaz 84

Figure 34 : Dendrogramme obtenu par l'algorithme Neighbor-Joining illustrant les relations entre profils RAPD des *Laccaria amethystina* récoltés dans la parcelle 59 de la réserve mycologique de La Chanéaz 85

Figure 35 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant des exemples de produits d'amplification de l'ITS et l'IGS 1, pour *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* 88

Figure 36 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant l'unique profil obtenu chez les sporophores de *Xerocomus chrysenteron* récoltés dans la parcelle 47 par l'amorce RAPD 174 89

Figure 37 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant l'unique profil obtenu chez les sporophores de *Xerocomus pruinatus* récoltés dans la parcelle 47 par l'amorce RAPD 174 89

Figure 38 : (page suivante) : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* dans la parcelle 47 de la réserve mycologique de La Chanéaz 89

Tableau 1 : Relation entre formations végétales et types de mycorhize 24

Tableau 2 : Taille d'"individus" d'Hyménomycètes saprophytes, selon leur type de stratégie nutritionnelle et leur habitat 30

Tableau 3 : Synopsis des structures de populations ectomycorhiziennes connues 62

Tableau 4 : Caractéristiques des populations de *Laccaria amethystina* dans la réserve mycologique de La Chanéaz 77

Tableau 5 : Matrice des indices de similarité de Jaccard calculée à partir des matrices de profils RAPD 82

Tableau 6 : Caractéristiques des populations de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* dans la réserve mycologique de La Chanéaz 87

2 RESUME

La symbiose ectomycorhizienne est une relation intime qui s'établit entre certains groupes de champignons et les racines de la plupart des arbres en climat tempéré. Elle joue un rôle prépondérant dans les cycles biogéochimiques des écosystèmes forestiers, par son influence positive sur la croissance des arbres, sur leur bilan hydrique et nutritif et sur la protection contre les pathogènes des racines.

Or, chaque arbre est confronté à un cortège d'espèces, chaque espèce étant elle-même structurée en populations génétiquement différenciées, notamment du point de vue physiologique. De ce fait, l'impact fonctionnel de chacune de ces populations sur la biologie de l'arbre est fortement variable. La connaissance de la structuration génétique des populations apparaît nécessairement comme un prélude à l'appréhension globale de phénomènes multifonctionnels et dynamiques. Une optique de gestion durable des ressources forestières ne peut avoir lieu que par la prise en compte de ces phénomènes, regroupés sous le terme d'écologie des communautés.

Malgré la prise de conscience du rôle essentiel des ectomycorhizes pendant la dernière décennie, peu d'études ont été entreprises pour améliorer la connaissance de la distribution spatiotemporelle des populations de champignons ectomycorhiziens. Ainsi, les processus contrôlant l'origine et le maintien de leur variation génétique, essentielles pour la compréhension de la dynamique des écosystèmes forestiers, sont encore hors de portée.

Notre étude d'écologie moléculaire, conduite dans la forêt mixte de la réserve mycologique de La Chanéaz (Suisse), avait pour but de déterminer l'importance relative de la reproduction sexuée et végétative chez trois espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens, *Laccaria amethystina* (Tricholomataceae sensu SINGER 1975), *Xerocomus chrysenteron* et *Xerocomus pruinatus* (Boletaceae). Cette question peut être résolue en établissant la structure génétique des populations présentes. Pour cela, les limites de chaque "individu" doivent être établies, ce qui, chez des champignons à croissance souterraine, n'est pas immédiat. Une récolte intensive de champignons pendant trois ans, suivie d'un typage moléculaire, a permis d'identifier les "individus" (génets) en présence, la surface qu'ils occupaient et comment elle a évolué dans le temps.

Nous n'avons trouvé qu'un seul profil par espèce pour tous les marqueurs utilisés chez les 146 *Xerocomus chrysenteron* et les 10 *Xerocomus pruinatus* analysés, dans une parcelle d'étude de 100 m^2. L'absence de polymorphisme des loci étudiés et l'étendue des génets suggère une croissance végétative du mycélium sur une longue période. La reproduction sexuée semble intervenir rarement chez ces espèces qui s'établissent durablement.

Contrastant avec ces résultats, la population de *Laccaria amethystina* a montré une diversité génétique élevée, les 209 sporophores analysés étant répartis en 157 génets, de petite taille, entremêlés (314 génets/100 m^2), et éphémères. Le génet le plus étendu occupait une surface d'environ 2.5 m de diamètre et comprenait 13 sporophores, mais la plupart des génets ne comprenaient qu'un seul sporophore. Ceci suggère que cette population de *Laccaria amethystina* maintienne une structure

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

génétique en accord avec une forte occurrence de reproduction sexuée, c'est-à-dire un renouvellement par les spores méiotiques.

Dans la forêt de La Chanéaz, les caractéristiques génétiques intrinsèques des espèces étudiées jouent un rôle plus important dans les stratégies de colonisation et de maintien que ne le fait l'habitat.

Mots-clés: ectomycorhize, génotypes, *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, *Xerocomus pruinatus*, génétique des populations, structure des populations, RAPD, ADN ribosomal.

3 OBJECTIFS

Pour situer ce travail dans une perspective générale, il faut rappeler que la compréhension de l'écosystème forestier passe par la connaissance des cycles biogéochimiques, dans lesquels les champignons, tout particulièrement ceux vivant en association étroite avec les racines des arbres (mycorhiziens), influencent de manière déterminante la vigueur et l'état sanitaire des arbres et donc la composition et la pérennité de l'écosystème.

Chaque espèce fongique mycorhizienne existe sous forme de population structurée en génets *, c'est-à-dire en mycélia génétiquement distincts les uns des autres. Le fait que les végétaux soient exposés à des mycobiontes * génétiquement diversifiés est de grande importance dans l'écologie des forêts. Les génets varient dans leur aptitude de colonisation, leur adaptation à des facteurs abiotiques, leur capacité à exploiter la matière organique et les éléments minéraux, et donc, de ce fait, à promouvoir la croissance de la plante hôte.

S'il est reconnu que les espèces mycorhiziennes se succèdent au fur et à mesure du développement des forêts, la connaissance de l'évolution de la structuration génétique des populations en présence n'est que fragmentaire. Alors que les écosystèmes forestiers matures étaient considérés comme n'abritant qu'un faible nombre de génets très étendus et durablement installés, il s'est avéré qu'il s'y trouvait des populations de Basidiomycètes ectomycorhiziens caractérisées par un degré élevé de diversité génétique et composées de nombreux petits génets éphémères. La question de savoir si cette structure de population dépend d'une hétérogénéité de l'habitat ou de caractéristiques génétiques de l'espèce reste ouverte.

Le site choisi pour notre étude est la réserve mycologique de La Chanéaz (canton de Fribourg, Suisse), siège de nombreuses études sur l'influence de l'environnement sur la flore fongique, conduites par l'Institut Fédéral de la Forêt, de la Neige et du Paysage. Nous avons mis à profit l'existence de parcelles clôturées pour étudier des espèces comestibles, dont la récolte exhaustive n'aurait pas été possible ailleurs.

De plus, cela permettait d'établir un lien avec le concept de protection des champignons en cours d'élaboration en Suisse, sous la direction de Béatrice Senn-Irlet, dans un contexte de régression des espèces mycorhiziennes. Dans le cadre de ce projet, la pertinence des mesures de protection telles que la limitation ou l'interdiction temporaire de la cueillette, déjà en vigueur dans de nombreux cantons suisses, devait être évaluée. C'est pourquoi nous avons été amenés à sélectionner des

espèces comestibles, car ce sont celles qui subissent la plus forte pression due à la cueillette.

Nous avons tenté de répondre aux questions suivantes :

1. *Comment une surface forestière occupée par une population d'une espèce donnée est-elle subdivisée en génets différents, identifiés par des marqueurs génétiques adéquats?*
2. *Quelle est la surface occupée par chaque génet ?*
3. *Peut-on observer des variations temporelles dans cette structure spatiale ?*

Les données obtenues devraient permettre de déterminer l'importance relative de la reproduction sexuée et de la croissance végétative, pour chaque espèce. Les stratégies d'établissement et de persistance pourront ainsi être inférées, dans un écosystème non perturbé, ouvrant la porte à une meilleure compréhension de la dynamique des populations ectomycorhiziennes.

4 PLAN

La présente étude porte sur la structure génétique des populations * de trois espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens. Cet exposé débute par un bref rappel du cycle biologique de ces champignons. Certains aspects de la symbiose mycorhizienne sont traités plus en détail, sous forme de synthèse bibliographique, dans la mesure de leur utilité dans la discussion des résultats. Ainsi, l'établissement et la durée de la symbiose, les contraintes auxquelles elle est soumise sont des questions essentielles pour la compréhension de la dynamique des populations.

Il nous a paru intéressant de donner un aperçu de la grande diversité spécifique * des champignons ectomycorhiziens. Après avoir abordé les différents facteurs biotiques et abiotiques dont le rôle dans la structuration des communautés * a été reconnu, nous nous attacherons à la description des populations.

Nous nous appuyons sur les principales études de génétique de populations ectomycorhiziennes, et des modèles explicatifs proposés, qui sont parfois en contradiction entre eux. Une synthèse des questions actuellement non résolues est tentée.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été acceptés à la publication le 13 août 2001 sous le titre "*Populations of ectomycorrhizal* Laccaria amethystina, Xerocomus *spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest*" (FIORE-DONNO & MARTIN 2001). Un tiré à part de cet article paru dans le *New Phytologist* figure dans l'annexe 1.

Nous avons rajouté, dans le texte du mémoire, des informations pratiques qui ont été exclues de l'article scientifique en raison des exigences de brièveté des publications. Nous tenons à situer du point de vue taxonomique les espèces * étudiées, à donner quelques indications écologiques supplémentaires sur les parcelles d'étude. Nous souhaitions illustrer les résultats par des images supplémentaires et à justifier le choix de l'échantillonnage, des méthodes moléculaires et statistiques employées.

La discussion porte essentiellement sur les interprétations possibles des différentes structures de populations trouvées jusqu'à présent. Les influences extrinsèques sont distinguées des influences intrinsèques. Nous exposons les hypothèses avancées par les auteurs des études citées, en les comparant entre elles, en montrant leurs limites ou leur pertinence.

Pour terminer, nous souhaitons revenir au but premier, celui d'apporter un éclairage, même partiel, aux stratégies de protection de champignons

Nous espérons avoir réussi, de la manière la plus compacte possible, à rendre compte du travail, des résultats et de leur interprétation de manière claire.

---

* pour une définition des termes signalés par un astérisque, se reporter au lexique (Chapitre 10).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

5 INTRODUCTION

5.1 La symbiose ectomycorhizienne dans les écosystèmes forestiers

5.1.1 Cycle biologique des Basidiomycètes

Ce qui est appelé communément le champignon n'est que le porteur de spores (sporophore *), partie apparente d'un organisme bien plus vaste, essentiellement souterrain (Figure 1 et Figure 2). Les basidiospores (en général, spores méiotiques haploïdes), sont produites en grandes quantités dans l'hyménium (dans les cas que nous abordons ici, situé sur les lamelles ou les pores), puis projetées autour du champignon. Si le milieu est favorable, elles germent en donnant naissance à des hyphes rayonnantes. L'hyphe est l'unité structurelle de base dans le règne des champignons (Mycota). Elle est filamenteuse, délimitée par une membrane et une paroi. La croissance est apicale, les branchements sont en général fréquents.

La masse des hyphes est appelée mycélium. Le mycélium haploïde primaire fusionne avec un mycélium sexuellement compatible (plasmogamie). Lors de cette fusion, les noyaux ne s'unissent pas, formant une structure unique dans le monde du vivant, propre aux Basidiomycètes, appelée dicaryon.

La plupart des Basidiomycètes sont hétérothalliques, c'est-à-dire que les mycélia haploïdes doivent être génétiquement différents pour fusionner. Le contrôle génétique est complexe, impliquant 1 à 4 loci multialléliques (DEBAUD *et al.* 1995). Deux systèmes de compatibilité sexuelle ont été reconnus. Dans les formes bipolaires (25 % des espèces hétérothalliques), la compatibilité sexuelle est contrôlée par un seul locus multiallélique. Les 75 % restants sont des espèces tétrapolaires, dans lesquelles deux loci multialléliques, non liés entre eux, sont impliqués. Pour que deux homocaryons tétrapolairès soient compatibles, les allèles dans les deux loci doivent être différents.

Peu d'espèces ectomycorhiziennes ont fait l'objet d'études génétiques approfondies. Parmi elles, *Hebeloma cylindrosporum* et, dans le genre *Laccaria*, *L. amethystina, L. bicolor, L. laccata* et *L. proxima* sont tétrapolaires (FRIES & MUELLER 1984, DEBAUD *et al.* 1995). Dans le genre *Suillus*, trois espèces au moins se sont révélées être bipolaires : *Suillus luteus, S. granulatus* et *S. bovinus* (FRIES & NEUMANN 1990, FRIES & SUN 1992).

Le mycélium dicaryotique continue sa croissance, les noyaux se répartissant le plus souvent à raison de deux (un de chaque mycélium compatible) par segment. Les hyphes ont tendance à se ramifier et à s'anastomoser entre elles, formant un réseau tridimensionnel. C'est le mycélium dicaryotique qui constitue la majeure partie de la phase végétative, et c'est lui qui forme les ectomycorhizes. Les mycélia monocaryotiques se sont révélés être moins performants dans l'établissement de la mycorhize (LAMHAMEDI *et al.* 1990).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Ce mycélium peut continuer à croître indéfiniment, en se différenciant en parties assimilatrices, exploratrices, symbiotiques ou primordia de fructifications. Il s'agit d'un système dynamique, le cytoplasme ayant tendance à migrer vers les parties en croissance, tandis que les parties plus âgées deviennent vacuolées et non fonctionnelles. L'apparition des sporophores, par différenciation de primordia, répond à des facteurs intrinsèques (génétiques) et extrinsèques - précipitations, température, notamment (STRAATSMA *et al.* 2001), mais aussi nutritionnels, dont les rôles respectifs n'ont pas pu encore être clairement établis.

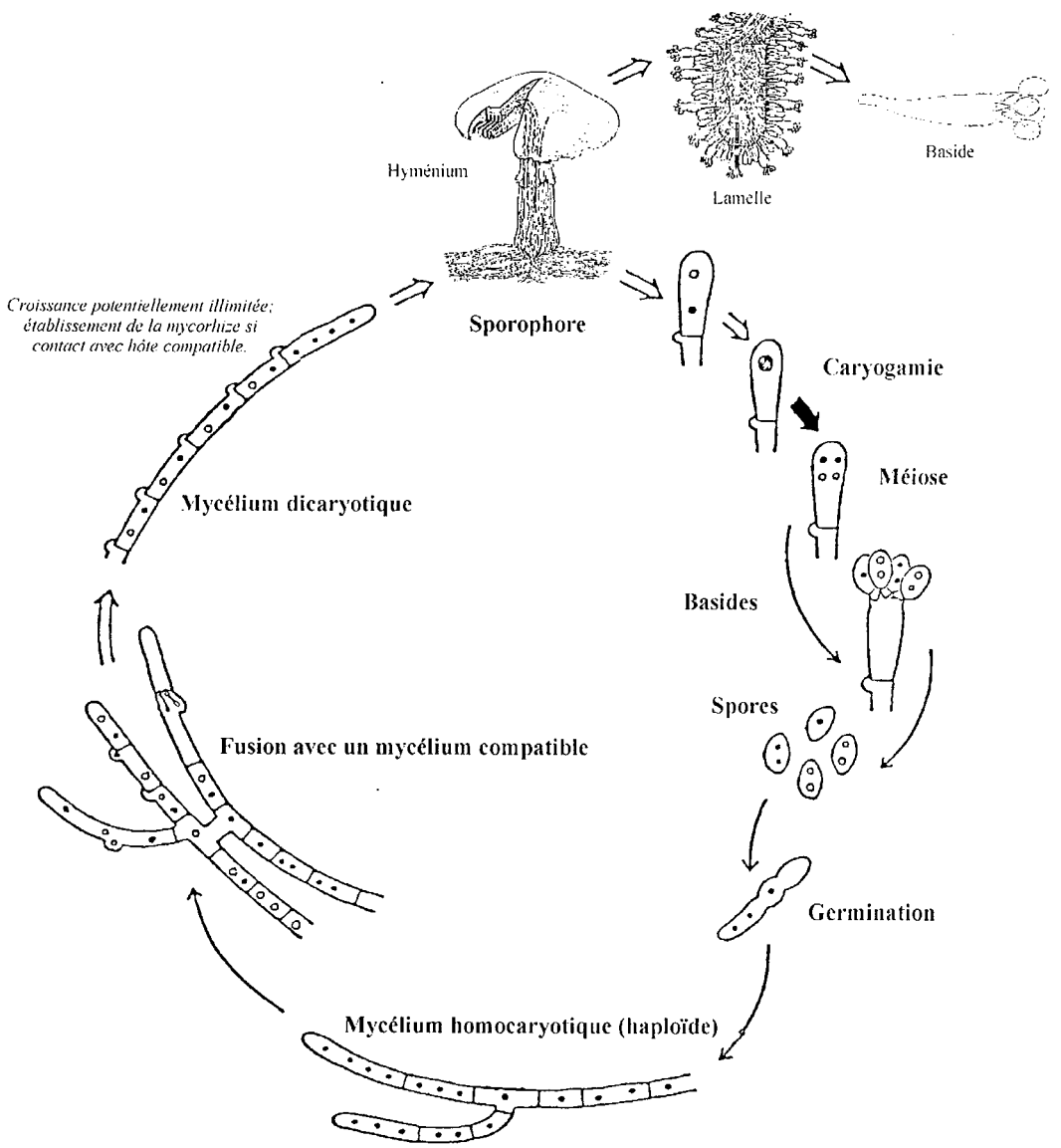


Figure 1 : Cycle de Basidiomycète – selon ARITA (1979) in CLEMENÇON (1997).

5.1.2 Structure de la mycorhize

Les mycorhizes sont des structures mixtes, résultant de la symbiose entre une plante vasculaire et le mycélium d'un champignon. Le mutualisme mycorhizien implique près de 95% des végétaux (SMITH & READ 1997) et seules quelques familles (p. ex. Brassicacées, Juncacées) échappent à cette règle. Chez les champignons mycorhiziens, l'association avec les racines d'une plante hôte est indispensable à la survie à long terme.

On distingue habituellement deux grands types, différant à maints égards, et de manière frappante par leur apparence : les endomycorhizes, où l'on constate une pénétration du champignon à l'intérieur de la cellule végétale, et les ectomycorhizes, où il n'y a pas de telle pénétration. Cependant, cette distinction peut devenir incertaine, puisque la plupart des champignons ectomycorhiziens peuvent pénétrer dans les parties sénescentes de l'axe racinaire, ou en cas de déséquilibre nutritionnel, ou en association avec certaines des plantes qui ne sont pas le partenaire habituel. Ainsi, le champignon mycorhizien peut se comporter occasionnellement comme un pathogène de faiblesse.

La plupart des champignons produisant des ectomycorhizes typiques sont associés à des partenaires végétaux dont la nutrition est fortement dépendante du champignon en conditions naturelles, essentiellement des ligneux, appartenant aux familles des Bétulacées, Fagacées, Pinacées et Salicacées (entre autres). Ces familles se retrouvent dans les forêts des climats tempéré à boréal, dont elles sont souvent l'essence dominante. Dans les forêts tropicales, la famille des Dipterocarpacées forme aussi des ectomycorhizes.

Les ectomycorhizes développent un vaste réseau mycélien à partir des racines de la plante hôte, dont l'ampleur est visible sur la Figure 2.

L'unité morphologique structurelle relative constatée dans les ectomycorhizes masque une grande diversité fonctionnelle. Une récente étude moléculaire vient confirmer qu'il s'agit d'un groupe polyphylétique, la symbiose étant apparue à plusieurs reprises dans des groupes taxonomiques très éloignés, et que certains taxa sont retournés secondairement à l'état saprophyte, par exemple les Agarics (HIBBETT *et al.* 2000).

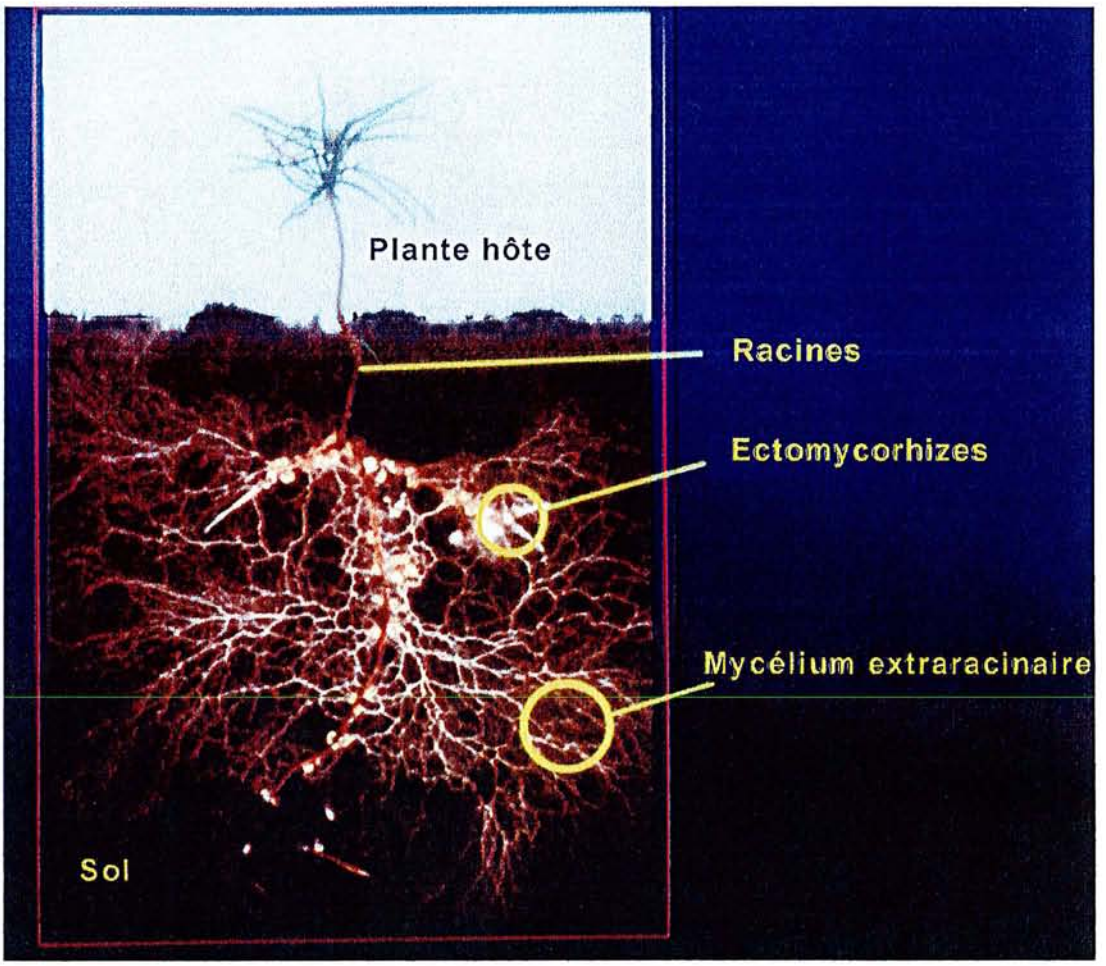


Figure 2 : Ectomycorhizes établies sur le système racinaire d'un jeune conifère. Noter le vaste réseau du mycélium extraracinaire.
Photographie tirée de SMITH & READ (1997).

L'ectomycorhize comprend trois composantes structurales :

a) Le manteau de "tissu" fongique qui entoure la racine ;

b) Un réseau d'hyphes croissant vers l'intérieur entre les cellules épidermiques et les cellules corticales de la racine, appelé le réseau de Hartig ;

c) Un mycélium diffus, se propageant à partir de la racine, à partir duquel se forment les sporophores en surface (Figure 4).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

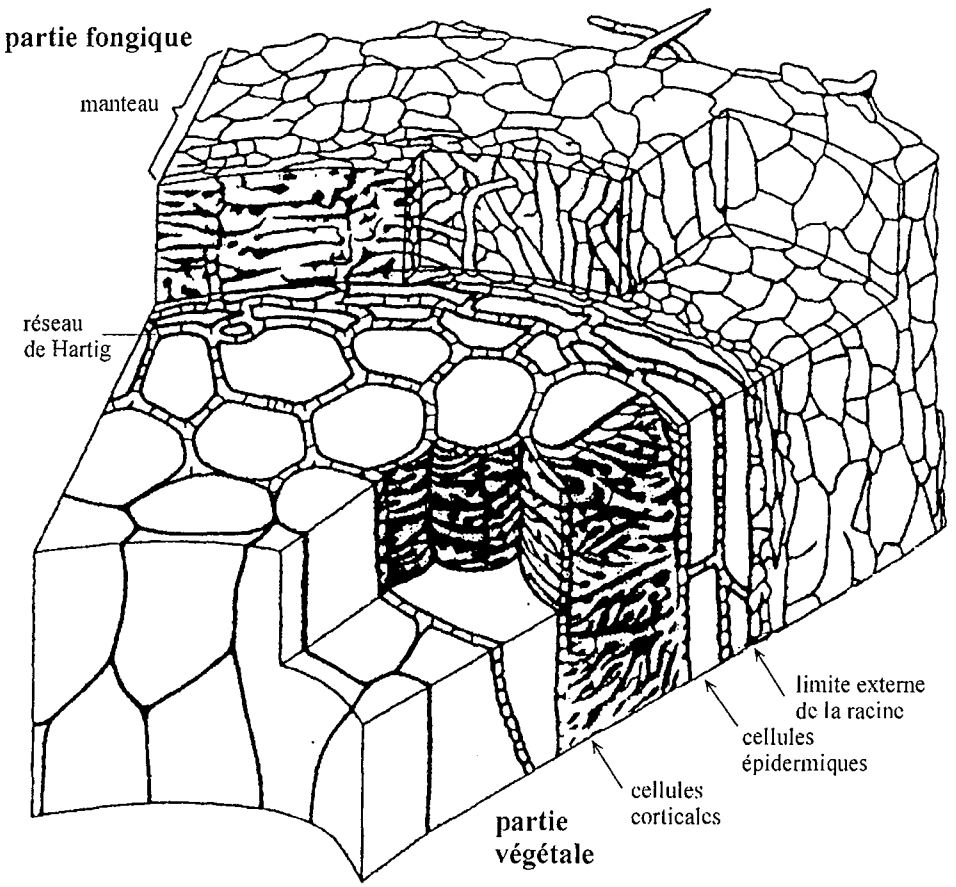


Figure 3 : Diagramme d'une ectomycorhize montrant les tissus sous différents angles. Le manteau présente une structure pseudoparenchymateuse. Selon BLASIUS *et al.*(1986) in CLEMENÇON (1997).

Le manteau, par son étroite adhérence à la racine et son épaisseur, constitue une réserve de nutriments et joue un rôle dans le transfert entre le champignon et la plante (SMITH & READ 1997). Il est constitué d'hyphes étroitement agglomérées et formant un pseudoparenchyme ou un plenctenchyme. C'est par les caractéristiques morphologiques et anatomiques du manteau que l'on peut rattacher un certain nombre de mycorhizes à un genre, voire même à l'espèce, grâce notamment à l'Atlas d'AGERER (AGERER 1987-1998).

Les hyphes du réseau de Hartig s'insinuent entre les cellules du cortex, sans s'introduire à l'intérieur. C'est au niveau du réseau de Hartig que s'effectuent les échanges d'éléments nutritifs (sucres, acides aminés, éléments minéraux) entre le champignon et la plante. La profondeur de la pénétration du réseau de Hartig dans les couches superficielles de la racine est différente dans les Angiospermes et les Gymnospermes. Alors que les hyphes ne pénètrent que le rang le plus externe des

cellules corticales chez la plupart des Angiospermes, elles entourent plusieurs couches de cellules chez les Gymnospermes.

Le mycélium extraracinaire s'étend sur de grands volumes de sol à partir du manteau, et assure ainsi les rôles d'exploration et d'absorption, et le transport des nutriments. Des rhizomorphes sont parfois différenciés dans ce mycélium, facilitant le transport bidirectionnel (CAIRNEY 1992), comme cela a été démontré pour le phosphore chez le champignon saprophyte *Hypholoma fasciculare* (LINDAHL *et al.* 2001).

Nous pouvons constater que la formation de l'ectomycorhize aboutit à de profondes modifications morphologiques chez les deux partenaires (Figure 4). Alors que les hyphes s'organisent de manière complexe en s'associant à la racine, celle-ci présente souvent une forme charnue et ramifiée, modification qui résulte de la synthèse de phytohormones par le champignon (IAA, GAY *et al.* 1994, GAY & DEBAUD 1987 et cytokinines, HO & TRAPPE 1987).

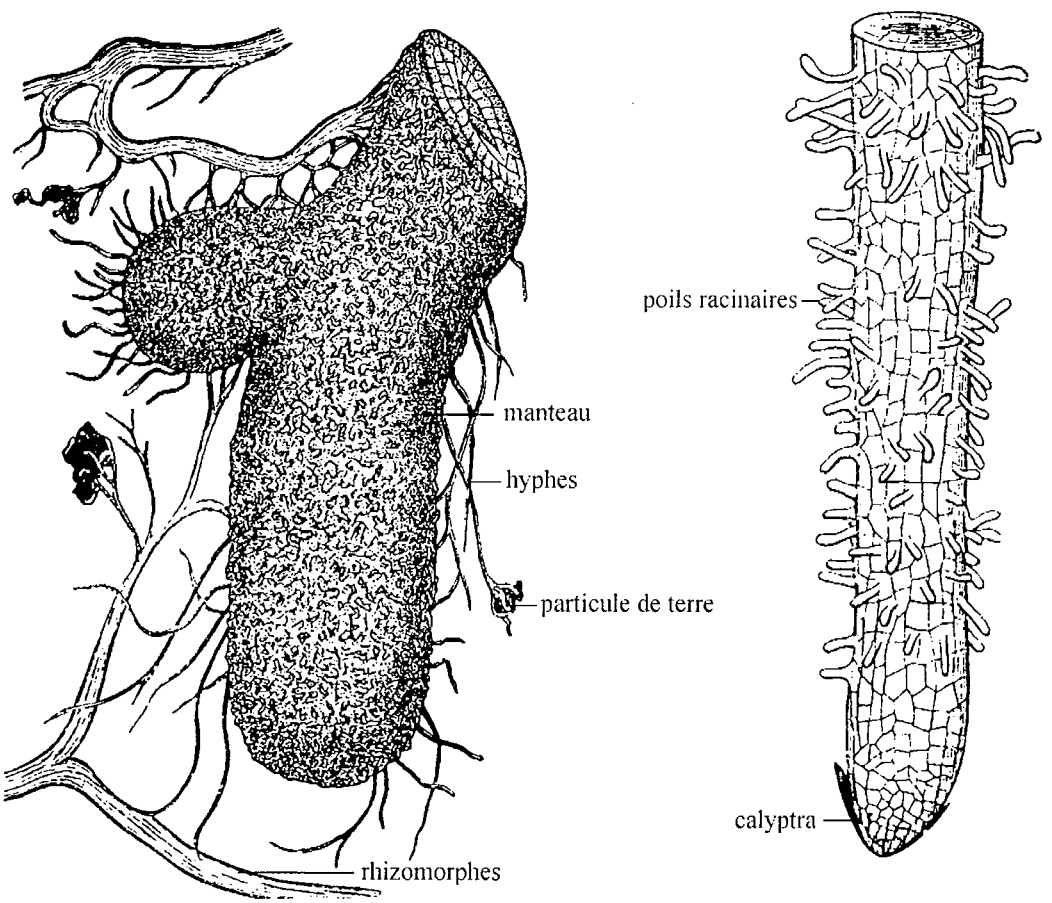


Figure 4 : Racine mycorhizée (à gauche) et non-mycorhizée (à droite) de *Fagus sylvatica.* Le volume plus important de la racine de gauche est dû au manteau mycélien, ainsi qu'à l'allongement radial des cellules corticales. Selon FRANK (1885), in CLEMENÇON (1997).

Différents types de rhizomorphes ont été décrits, et mis en relation avec l'aptitude du mycélium à coloniser des surfaces plus ou moins étendues. Le niveau d'organisation le plus simple est trouvé dans des Ascomycètes comme *Cenococcum geophilum* et *Tuber spp.*, dont les hyphes qui émanent du manteau croissent en tant qu'élément isolé. Les hyphes extraracinaires de la majorité des Basidiomycètes s'organisent par contre selon un niveau d'agrégation plus ou moins important.

AGERER (1991) a décrit six types de rhizomorphes (Figure 5), variant dans leur degré de différenciation hyphale. Le premier, le type A, est constitué d'un agrégat peu dense et aux limites indéfinies d'hyphes de même diamètre. Il a été décrit chez *Cortinarius obtusus*, *Dermocybe cinnamomea* et *Tricholoma sulfureum*. Bien qu'indifférencié, le type B est plus compact, avec une marge lisse chez *Laccaria* et *Lactarius* spp. Une différenciation entre hyphes externes et internes apparaît dans le type C, ces dernières étant légèrement élargies. On le trouve chez *Gomphidius glutinosus* et *Telephora terrestris*.

Dans le type D, les hyphes plus considérablement élargies sont mêlées avec des hyphes plus fines, deux autres espèces de Cortinaires présentant cette caractéristique (*C. hercynicus* et *C. variecolor*). Les hyphes élargies sont regroupées au centre du rhizomorphe dans les types E et F. Dans ce dernier, les septa tendent à disparaître, produisant une structure analogue aux vaisseaux conducteurs des plantes supérieures. Le type E a été décrit notamment chez *Tricholoma saponaceum*, alors que le type F, se trouve chez de nombreuses Bolétacées, comme *Xerocomus chrysenteron*, *Suillus bovinus*, *Leccinum scabrum*.

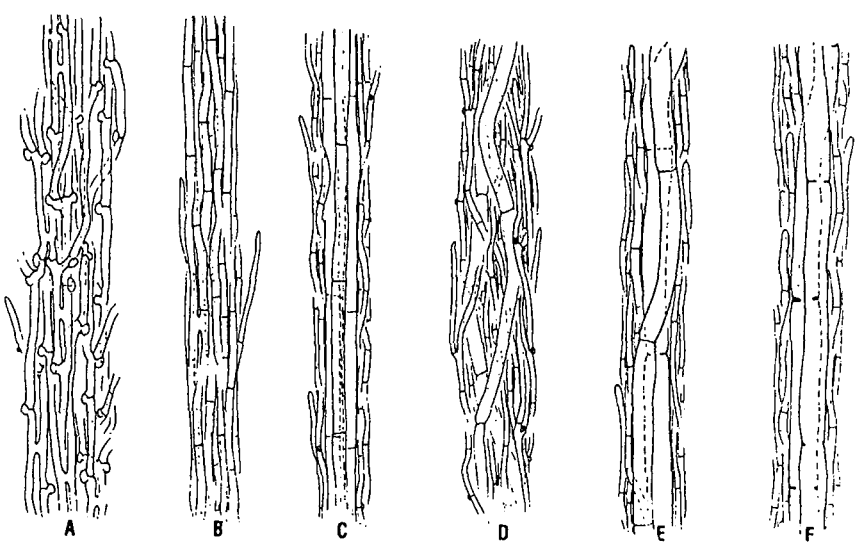


Figure 5 : Représentation schématique des six types de rhizomorphes formés par les champignons ectomycorhiziens. Tiré de AGERER (1991).

5.1.3 Etablissement de la mycorhize

La symbiose ectomycorhizienne s'établit spontanément à partir de propagules présentes dans le sol. GARBAYE (1991) a décrit l'infection par trois types de propagules dormantes, assurant la conservation du champignon, ce sont : les spores, des vieilles mycorhizes où le réseau de Hartig est encore vivant et de petits amas de mycélium protégés dans des microsites favorables (Figure 6). D'autres propagules sont naturellement utilisées par les champignons ectomycorhiziens, comme des sclérotes ou pseudosclérotes. Ces propagules sont dispersées dans le sol superficiel (GARBAYE 1991).

Le système racinaire des arbres se différencie en racines longues, ayant un potentiel de croissance illimité, à partir duquel se développent de manière saisonnière des racines plus fines, produisant à leur tour des radicelles. Ce sont les racines fines, de deuxième ou troisième ordre, qui se prêtent à la mycorhisation. Les poils racinaires prolifèrent sur la surface qui se libère juste en retrait de l'apex, formant une étendue susceptible de rentrer en contact avec un mycélium. Le réseau de Hartig ne peut se développer que dans cette zone racinaire nouvellement formée ou dans des racines latérales émergentes. En effet, au fur et à mesure de la croissance de la racine, la paroi des cellules végétales se lignifie, ne permettant plus la pénétration des hyphes (SMITH & READ 1997).

De molécules signal sont produites précocement, par la plante et le champignon, entraînant une cascades de réponses conduisant au contact, à l'adhésion et éventuellement à la symbiose (MARTIN *et al.* 1997). Les racines sécrètent des composés dans leur environnement immédiat, dont certains pourraient jouer le rôle d'attracteurs pour le champignon, par chemotropisme sélectif (HORAN & CHILVERS 1990). La nature des molécules signal responsables du flux informatif est encore l'objet de recherches (MARTIN *et al.* 2000). L'élucidation des mécanismes de reconnaissance précoces entre les champignons et la plante a pu progresser grâce à l'association in vitro de plantules d'arbres aux mycélia. Le couple *Eucalyptus-Pisolithus tinctorius* a servi notamment de modèle pour de nombreuses recherches (cf. MARTIN 2001).

Des protéines de la paroi cellulaire du champignon, appelées hydrophobines, identifiées il y a quelques années déjà, jouent un rôle dans la reconnaissance de la racine par les hyphes et dans leur adhésion (MARTIN & TAGU 1999, TAGU & MARTIN 1996).

Mais les recherches les plus récentes ou en cours visent à établir des liens fonctionnels entre l'expression des gènes et les événements clés de la reconnaissance et l'établissement de la mycorhize (cf. MARTIN 2001). Les signaux moléculaires, échangés déjà aux stades préinfectieux, sont en voie d'être connus. La sécrétion d'auxine fongique induit la formation de racines latérales chez la plante, et favorise de ce fait l'établissement de la symbiose (GAY *et al.* 1994, mais voir aussi WALLANDER *et al.* 1992).

L'accumulation d'hypaphorine (une petite molécule résultant d'une modification du tryptophane) dans les hyphes augmente sensiblement dès le premier contact avec la

racine, et l'hypaphorine réduit l'allongement de la racine (BÉGUIRISTAIN & LAPEYRIE 1997). L'hypaphorine exercerait une influence régulatrice sur l'activité de l'IAA (une auxine) dans la plante selon DITENGOU & LAPEYRIE (2000). La régulation de cette activité semble nécessaire, puisque l'IAA seul provoque aussi des modifications morphologiques racinaires non observées dans la mycorhize.

Récemment, 65 gènes SR (*symbiosis-regulated*) ont été reconnus comme s'exprimant de manière différenciée (soit un accroissement de l'expression, soit une diminution) pendant l'établissement du manteau ectomycorhizien dans l'association *Eucalyptus-Pisolithus* (VOIBLET *et al.* 2001).

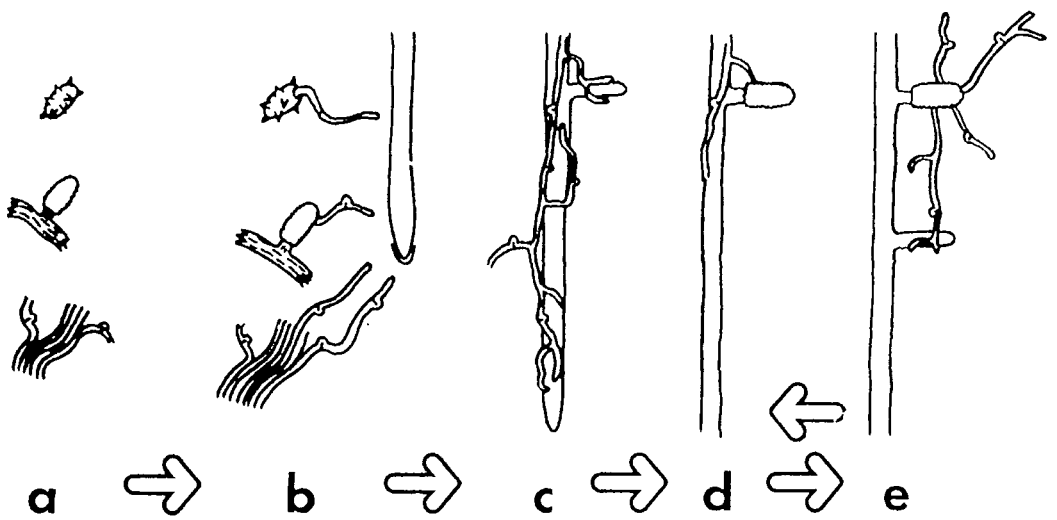


Figure 6 : Etapes de l'infection ectomycorhizienne spontanée à partir de propagules naturelles présentes dans le sol. Trois type de propagules dormantes dans le sol, assurant la conservation et la reproduction du champignon ectomycorhizien sont représentées, de haut en bas : **a** : spore, vieille mycorhize, amas mycélien. **b** : les propagules germent ou reprennent leur activité en présence des exsudats d'une racine compatible. **c** : le mycélium, en phase saprophyte aux dépens des exsudats, colonise la surface de la racine principale en élongation, et atteint une première racine courte latérale réceptive à l'établissement de la symbiose. **d** : une première mycorhize est formée avec cette racine courte (infection primaire) ; le champignon est en phase symbiotique, et la partie saprophyte du thalle qui avait assuré sa progression régresse du fait du vieillissement et de la subérisation de la racine longue qui n'exsude plus. **e** : une des hyphes extramatricielle irradiant de la mycorhize nouvellement formée atteint une seconde racine courte et va l'infecter à son tour (infection secondaire) ; la répétition des étapes d et e assurera la propagation de la symbiose (GARBAYE 1991).

Une fonction a pu être avancée par analogie de séquence pour une partie de ces gènes, et la plupart codent pour des protéines régulatrices de la traduction, des protéines pariétales et des enzymes. L'approche utilisée, l'hybridation sélective effectuée dans une banque d'ADN complémentaires extraits des jeunes mycorhizes, permet d'identifier un grand nombre de gènes à la fois.

Le processus de colonisation d'une portion de racine peut survenir en quelques heures ou quelques jours, de 4 à 10 (MASSICOTTE *et al.* 1989) selon les espèces considérées.

5.1.4 Durée de vie de la mycorhize et du mycélium extraracinaire.

La durée de vie de la mycorhize dépend étroitement de la sénescence des cellules végétales impliquées dans le réseau de Hartig, qui précède de peu celle de tout le réseau de Hartig. Des cellules sénescentes ont été observées dans des mycorhizes âgées de 60-85 jours chez *Tylospora* et de 25-50 jours chez *Paxillus involutus* (DOWNES *et al.* 1992). Dans les parties âgées de la racine, les hyphes peuvent pénétrer dans les cellules corticales (NYLUND *et al.* 1982). Dans un premier temps, la racine garde le potentiel de produire des bourgeonnements latéraux, et le mycélium celui de continuer à croître. Une étude récente rapporte que la durée de vie des ectomycorhizes de *Picea abies* varie selon le type de racine considérée et sa profondeur dans le sol. La plus grande longévité (980 jours) a été observée chez les mycorhizes des racines sans branchements émergeant directement de la racine longue, situées à une profondeur de 40-85 cm, c'est-à-dire à l'abri du gel hivernal (MAJDI *et al.* 2001).

Du côté de la plante, la durée de vie des racines courtes est de 2-3 mois, mais comme la racine longue continue de croître, de nouvelles racines courtes sont générées tout au long de la saison. Les racines latérales qui bourgeonnent juste en retrait de l'apex traversent le manteau déjà installé et devraient de ce fait être immédiatement colonisées. Par contre, l'apex de la racine croît un peu plus rapidement que le manteau mycélien, laissant ainsi la possibilité à des nouveaux venus de s'installer. Cette particularité pourrait expliquer la diversité d'espèces et de populations (PEROTTO *et al.* 1996) ou de génets (GUIDOT 2000) observés côte à côte sur le même tronçon de racine, respectivement de *Calluna vulgaris* (mycorhizes éricoïdes) et *Pinus pinaster* (ectomycorhizes de *Hebeloma cylindrosporum*).

Bien que la croissance des racines s'arrête (ou ralentisse) pendant l'hiver, certains mycélia extraracinaires ont la faculté de continuer à pousser, comme celui de *Telephora terrestris*. Ce champignon, en terrain submergé pendant la mauvaise saison, voit son mycélium disparaître, mais se régénère à partir des rhizomorphes qui ont survécu, dès que les conditions s'améliorent (COUTTS & NICHOLL 1990a). Par contre, le mycélium de *Laccaria laccata* n'est plus visible à partir de novembre (COUTTS & NICHOLL 1990b). Une succession saisonnière d'espèces mycorhiziennes a également été constatée durant la saison, sur un même système racinaire: les mycorizhes de *Lactarius* et *Paxillus*, absents en été, sont apparus en automne, alors qu'*Hebeloma* et *Inocybe* étaient plus abondants en automne (VAN DER HEIJDEN 2000).

5.1.5 Aspects nutritionnels

La plante fournit au champignon ectomycorhizien l'apport carboné, indispensable à sa croissance et fonctionnement, l'ensemble des ectomycorhizes consommant entre 10 et 40% des photosynthétats de la plante. Récemment, la part de la perte de CO_2 due à la respiration des mycorhizes a pu être évaluée à la moitié de la respiration totale du sol forestier boréal (HÖGBERG *et al.* 2001).

Les hyphes qui prospectent le sol à partir de la mycorhize absorbent les nutriments par un métabolisme actif et transportent les ions et autres métabolites vers la racine (MARTIN *et al.* 2000). Le champignon est capable d'extraire, en plus des phosphates et nitrates minéraux solubles, l'azote, le phosphore et le potassium des composés organiques de la litière et du sol sous-jacent (SMITH & READ 1997, PARIS *et al.* 1995). Ces capacités peuvent expliquer le succès des ectomycorhizes dans les sols tempérés, où les fréquentes basses températures ralentissent l'altération de la roche-mère et la minéralisation de la matière organique.

On a longtemps pensé que les champignons mycorhiziens étaient incapables de puiser le carbone dans le milieu, et qu'ils étaient de ce fait très dépendants du carbone fourni par la plante (FRANK 1885). Or, nous sommes en présence d'une grande diversité de comportements, allant de l'incapacité à exploiter les molécules organiques du sol à des capacités identiques à celles des saprophytes, en utilisant des enzymes permettant de dégrader des molécules complexes et récupérer non seulement le carbone, mais aussi l'azote et le phosphore (PEREZ-MORENO & READ 2000, DIGHTON 1991). En résumé, le carbone est acquis par le champignon ectomycorhizien de trois manières (HAMPP & SCHAEFFER 1995):

- par la translocation des photosynthétats de l'hôte,
- par la fixation de dioxyde de carbone dans les cellules hyphales et de la racine,
- par l'assimilation consécutive à la dégradation de polymères carbonés dans le sol.

ABUZINADAH & READ (1986) ont classé les ectomycorhiziens en trois groupes, en fonction des leurs capacités protéolytiques. Les champignons capables d'utiliser les protéines pour obtenir de l'azote (*Amanita muscaria*, *Suillus bovinus*) sont aussi des champignons considérés comme appartenant au stade tardif (cf. § 5.3.1), alors que *Lactarius rufus* et *Laccaria laccata*, du stade précoce, n'ont pas cette capacité. Au troisième groupe, présentant des caractéristiques intermédiaires, appartient *Pisolithus tinctorius*. Les hyphes peuvent s'attacher préférentiellement à des particules organiques (Figure 4).

Des expériences récentes ont permis de montrer que les champignons s'associant avec diverses espèces d'arbres et entretenant un mycélium extraracinaire étendu ont la capacité de transférer du carbone (notamment, mais probablement d'autres nutriments) d'un arbre à l'autre (FINLAY & READ 1986), ce qui a été constaté aussi in situ (SIMARD *et al.* 1997), même entre espèces végétales différentes (MCKENDRICK *et al.* 2000). La croissance d'arbres de différentes espèces, en présence d'un mélange d'inoculum, se fait de manière plus harmonieuse, en réduisant

les différences entre les rythmes de croissance propres à chaque espèce d'arbre (FINLAY 1989, PERRY *et al.* 1989). Un véritable réseau souterrain de communication s'établirait entre certains composants de l'écosystème forestier, par l'intermédiaire des champignons mycorhiziens.

Du point de vue des bénéfices pour la plante hôte, le concept de la multifonctionnalité de la symbiose mycorhizienne a été introduit par (NEWSHAM *et al.* 1995). Selon ce concept, chaque espèce mycorhizienne ne peut à elle seule assurer tous les effets positifs de la symbiose, comme l'accroissement de l'approvisionnement en nutriments, une meilleure récupération après un stress, une protection contre les parasites, des bénéfices non nutritionnels. Du point de vue de la plante, une grande diversité de communautés et populations de champignons symbiotiques sur son système racinaire lui serait donc favorable.

5.1.6 Stratification verticale

Les ectomycorhizes sont localisées dans les couches supérieures du sol, soit les couches organiques (litière, humus), ou à l'interface avec l'horizon minéral. Les racines prolifèrent de préférence dans l'horizon de fermentation, immédiatement au-dessous de la litière de surface. La proportion des différents types de mycorhizes varie dans chaque fraction du sol (HARVEY *et al.* 1979), et en fonction du climat.

Une stratification verticale des mycélia a été décrite, et d'après READ (1991), pourrait être liée aux capacités protéolytiques inhérentes à chaque espèce. OGAWA (1985) remarque dans les forêts subalpines du Japon que la répartition des mycorhizes est en relation avec leur biologie et leur structure. Ainsi, les mycorhiziens qu'il définit comme obligatoires, à rhizomorphes développés et mycorhizes pennées ou coralloïdes, coloniseraient les horizons FH et F (respectivement OH et OF du Référentiel pédologique français, 1992). Les mycorhiziens qu'il définit comme facultatifs, à mycorhizes dispersées, et les saprophytes, cohabiteraient surtout dans l'horizon F. Dans la plupart des cas, les mycorhizes sont localisées dans les horizons organiques.

5.2 Diversité des champignons mycorhiziens

On connaît actuellement 22'244 espèces de Basidiomycètes (HAWKSWORTH *et al.* 1995), parmi lesquelles moins de 5'000 sont considérées comme ectomycorhiziennes (MOLINA *et al.* 1992). Cet inventaire n'est pas exhaustif, puisque des espèces supposées être saprophytes ont été détectées dans les mycorhizes par des outils moléculaires, comme les Tomentelles, qui forment des sporophores résupinés sur bois mort tombé au sol (KÕLJALG *et al.* 2000).

Des 32'267 espèces d'Ascomycètes (HAWKSWORTH *et al.* 1995), seulement 500 sont ectomycorhiziennes (MAIA *et al.* 1996). Néanmoins, ce chiffre est probablement sous-estimé, puisqu'un grand nombre de morphotypes non identifiés seraient des Ascomycètes (VRÅLSTAD *et al.* 1998). Récemment, un morphotype rencontré fréquemment sur les ligneux en situation pionnière a pu être apparenté au genre *Hymenoscyphus* (VRÅLSTAD *et al.* 2000).

BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Parmi les endomycorhiziens, la diversité est plus réduite, car seulement 160 espèces de Glomales, sur 1056 espèces de Zygomycètes (HAWKSWORTH *et al.* 1995), en forment. En comparant ces chiffres avec les 100- à 150'000 espèces de champignons décrites, ou avec les 1'500'000 espèces supposées exister (HAWKSWORTH & ROSSMAN 1997), le nombre d'espèces mycorhiziennes semble restreint.

Les taxa les plus abondants dans les communautés ectomycorhiziennes appartiennent aux Russulaceae, Thelephoraceae, ainsi que d'autres champignons résupinés apparentés ou non aux Thelephoraceae, d'après nos connaissances actuelles, dépendantes des écosystèmes étudiés (HORTON & BRUNS 2001).

5.2.1 Principaux facteurs influant sur la diversité des communautés mycorhiziennes

Les communautés mycorhiziennes sont d'une grande richesse en espèces, et le défi actuel est de mieux connaître la diversité génétique et fonctionnelle des communautés et des populations de champignons mycorhiziens, ainsi que l'évolution de cette diversité dans différents écosystèmes. Nous tenterons d'aborder ce dernier point au paragraphe 5.3, en se centrant sur les champignons ectomycorhiziens.

La composition spécifique des communautés est clairement liée au milieu, et, tout comme celui-ci, évolue au cours du temps. Les mécanismes biotiques et abiotiques, seulement partiellement élucidés, qui contrôlent la diversité et son évolution sont nombreux ; de plus, il faut distinguer des échelles spatiales de la diversité, globale, régionale et au niveau d'une racine (BRUNS 1995).

L'interprétation à différentes échelles de paramètres multiples suffit certainement à justifier que les processus qui maintiennent une diversité mycorhizienne très élevée en forêt soient en partie encore inconnus. En extrapolant les études effectuées sur d'autres organismes, notamment les plantes, d'après (TAYLOR & BRUNS 1999) les rôles principaux pourraient être résumés ainsi:

• stratégies de reproduction (§ 5.2.3.1)	*en interrelation avec*:
• utilisation des ressources (§ 5.2.3.4)	propagation, colonisation de l'hôte (§ 5.2.3)
• résistance aux perturbations (§ 5.2.4)	maintien du mycélium (§ 5.2.3.2, 5.2.3.3)

Nous avons tenté d'illustrer l'ensemble de ces facteurs dans la Figure 7.

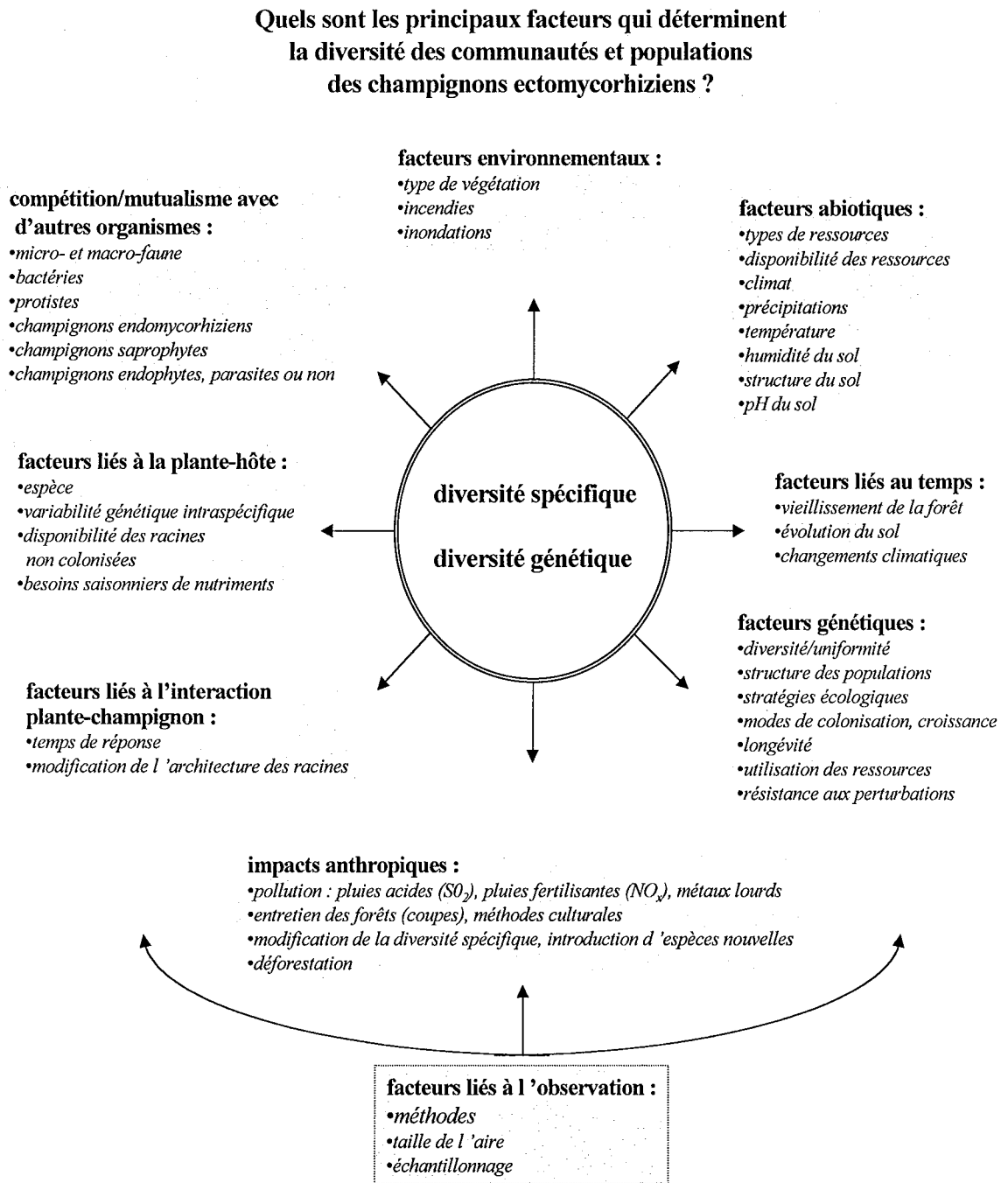


Figure 7: Principaux facteurs qui déterminent la diversité des communautés et populations des champignons ectomycorhiziens.

5.2.2 Répartition en fonction des formations végétales

Le facteur principal structurant la répartition des différents **types mycorhiziens** (éricoïde, ecto- et endomycorhizien) semble être le climax, car la distribution des différents types mycorhiziens dans les biomes terrestres n'est pas aléatoire (READ 1991). Ainsi, les formations végétales arctiques et alpines sont dominées par des plantes qui forment les mycorhizes de type éricoïde, celles boréales et tempérés sont dominées par des plantes ectomycorhiziennes, et les forêts subtropicales et tropicales par des plantes formant des endomycorhizes (Tableau 1).

Tableau 1 : Relation entre formations végétales et types de mycorhize.

formation végétale	**type de mycorhize**
tourbière	Vésiculaire-arbusculaire Ericoïde
forêt caducifoliée	Ectomycorhize, VA
forêt résineuse	Ectomycorhize
prairies et pelouses	Vésiculaire-arbusculaire
forêt tropicale	Vésiculaire-arbusculaire Ectomycorhize

Ultérieurement, READ (1984) a postulé un rapport entre la latitude ou l'altitude, le climat, le sol et le type de mycorhize, ainsi que la structure du mycélium associé à la mycorhize. A l'intérieur de chaque formation, l'occurrence des plantes à endo- ou ectomycorhizes est dépendante du type de sol. Ainsi, dans les régions tempérées, où les forêts sont dominées par les Fagacées et les Pinacées, familles essentiellement ectomycorhiziennes, les sols sont acides, la litière s'accumule et l'humus a un profil de type mor. Dans ces forêts, l'azote est séquestré sous forme organique (dans la litière, notamment) et les ectomycorhizes le rendent accessible aux arbres. Les arbres endomycorhiziens se trouvent sur des sols plus fertiles, neutres, où la litière se dégrade et l'humus est de type mull, l'azote présent sous forme minérale (Figure 8).

Ce qui émerge du nombre croissant d'études sur la fonction des mycorhizes dans les écosystèmes, c'est que chaque type de symbiose remplit des fonctions multiples, probablement adaptées aux exigences particulières de chaque système.

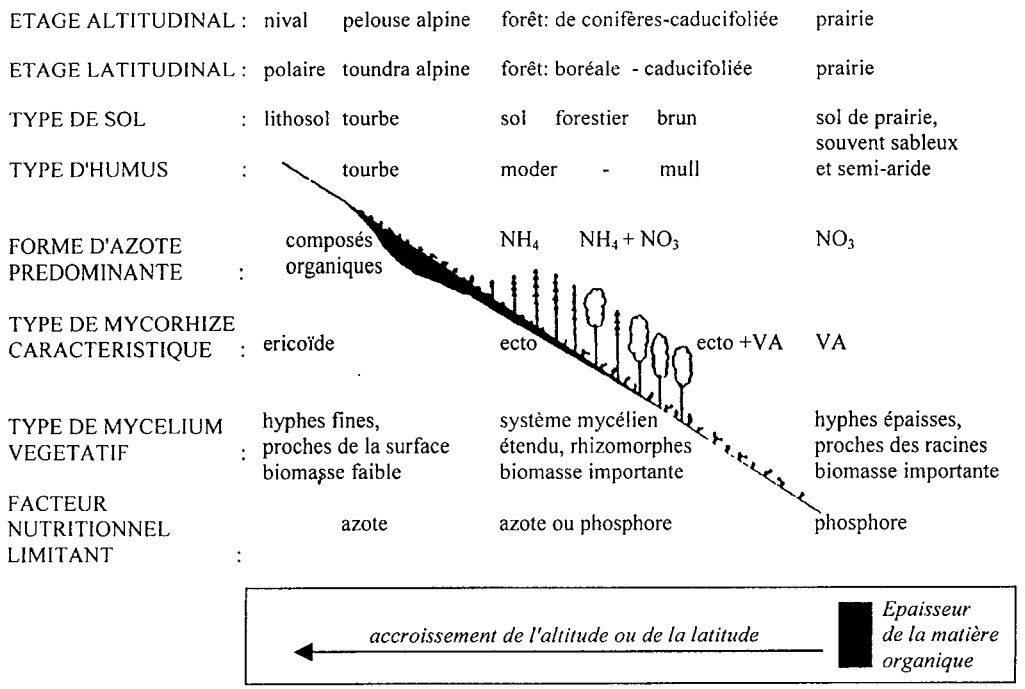


Figure 8 : Relation supposée entre la latitude (ou l'altitude), le climat, le sol, et le type de mycorhize, ainsi que le développement du mycélium végétatif associé aux mycorhizes. Modifié à partir de SMITH et READ (1997).

Cependant, il convient de relever que la diversité des champignons mycorhiziens ne suit pas celle des plantes supérieures. Par exemple, les forêts de conifères pauvres en espèces végétales peuvent abriter des centaines d'espèces ectomycorhiziennes, alors que les forêts tropicales n'hébergent qu'une douzaine d'espèces endomycorhiziennes (ALLEN *et al.* 1995). En général, les champignons ectomycorhiziens se montrent plus sélectifs par rapport à leur hôte végétal que les endomycorhiziens, qui sont plus généralistes (Figure 9).

En examinant la répartition des **champignons ectomycorhiziens** entre continents, on constate une similitude au niveau des genres, mais pas des espèces, et seules 27 % des espèces sont communes aux zones tempérées d'Europe et d'Amérique du Nord (ALLEN *et al.* 1995). De même, on trouve des genres communs à l'Australie, l'Amérique et l'Europe, alors qu'il n'y aucun genre de plante commun à l'Australie et les autres continents. Les auteurs supposent ainsi qu'un échange génétique continu a eu lieu entre continents, par les spores. Ceci est confirmé par l'endémisme plus élevé au niveau des champignons hypogés, dont la dispersion des spores, assurée par les animaux (insectes et mammifères), n'a lieu qu'à courte distance (ALLEN *et al.* 1995).

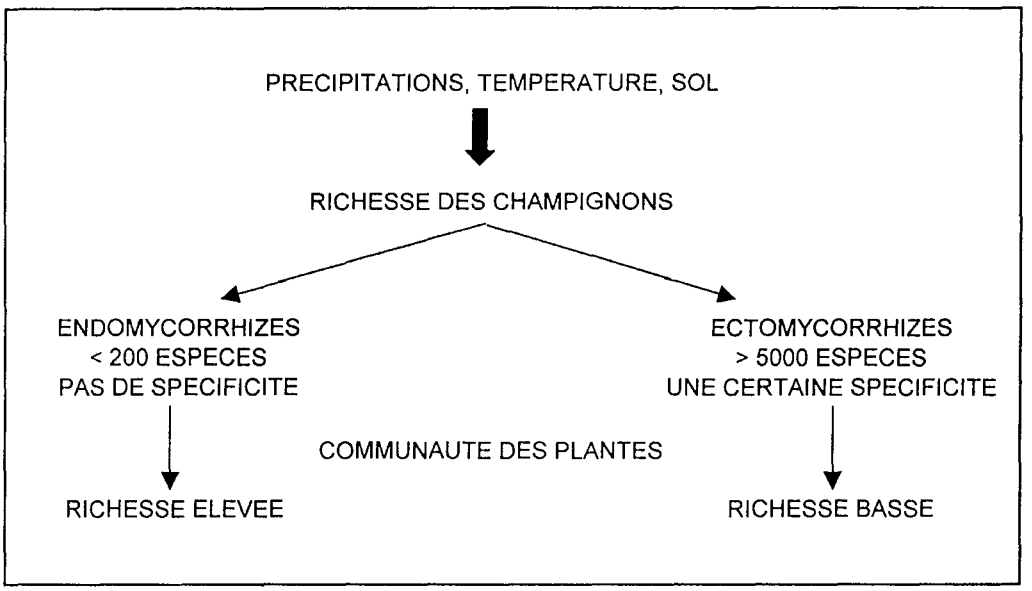


Figure 9 : Relations entre les conditions environnementales, le type de mycorhize, et la richesse * des plantes et des champignons. Tiré de (ALLEN *et al.* 1995).

La sélectivité des champignons versus les plantes est très variable: si certaines espèces de champignons ectomycorhiziens s'associent indifféremment à de nombreux arbres, d'autres sont liées à un genre, voire à une espèce. Comme exemple de la première catégorie, *Hebeloma cylindrosporum* forme des mycorhizes avec au moins sept espèces d'Angiospermes et 10 espèces de Gymnospermes (MARMEISSE *et al.* 1999). Par contre, le genre *Leccinum* est associé à divers feuillus, mais *Leccinum versipelle*, *L. scabrum* et *L. holopus* sont liés exclusivement aux bouleaux (voir par exemple BREITENBACH & KRÄNZLIN 1984-2000). Le genre *Suillus* est associé aux Pinacées, mais certaines espèces sont spécifiques du mélèze, comme *Suillus tridentinus* et *S. grevillei* (voir par exemple BREITENBACH & KRÄNZLIN 1984-2000). La plupart des champignons se retrouvent dans une position intermédiaire, en s'associant à une ou quelques familles de plantes (MOLINA *et al.* 1992).

Les arbres aussi peuvent montrer des préférences. Ainsi, certaines espèces ont un cortège ectomycorhizien très riche, comme *Picea*, *Quercus*, *Carpinus*, *Betula*, *Alnus*, alors que d'autres n'hébergent que peu d'espèces, comme *Pinus*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Acer*, *Populus* (SENN-IRLET 1997).

Une variabilité existe aussi dans un type de végétation donné: une analyse de sites forestiers le long d'un transect Nord-Sud en Europe a montré qu'une grande diversité inter sites existait: 78 % des espèces étaient propres à un seul site, même en ne considérant que les forêts de *Picea* monospécifiques (TAYLOR *et al.* 2000).

5.2.3 Caractéristiques biologiques et génétiques des champignons

Les populations naturelles des champignons ectomycorhiziens sont composées de mycélia génétiquement différents, séparés les uns des autres par les réactions d'incompatibilité somatique (cf. § 5.4.1).

5.2.3.1 Reproduction et établissement du mycélium

La reproduction sexuée par les méiospores assure un renouvellement génétique, contrairement à la reproduction clonale, qui est assurée soit par l'accroissement du mycélium, soit par des propagules présentes dans le sol superficiel, comme des amas mycéliens ou des sclérotes (cf. § 5.1.3 et), soit par des spores mitotiques, comme les conidies.

Chez les Hyménomycètes *, la reproduction se fait essentiellement par les basidiospores, produites en nombre extraordinaire par les sporophores. Ces spores sont des méiospores, et assurent un renouvellement génétique.

Chez les basidiomes épigés à hyménium externe, les spores s'éjectent elles-mêmes à très courte distance (BULLER 1909 in CLÉMENÇON 1997), mais on retrouve des spores dans la haute atmosphère (INGOLD 1971), ce qui indique qu'une faible fraction peut être transportée par le vent et les courants atmosphériques, pour assurer la colonisation de nouveaux milieux. Il est évident que la distance à laquelle les spores se répartissent in situ est un facteur essentiel dans la structuration des populations, déterminant les flux de gènes.

Or, il a été démontré par une élégante étude réalisée par une identification génétique des spores de *Schizophyllum commune* piégées dans les Caraïbes, que, bien que les spores piégées montrent une grande diversité génétique, la dispersion à longue distance, par-dessus une barrière aquatique, n'est pas un événement commun (JAMES & VILGALYS 2001).

Ces observations ont été confirmées par l'étude génétique de *Suillus grevillei* qui montre à la fois un flux de gènes important et un regroupement spatial de génotypes * apparentés (ZHOU *et al.* 2001). La dispersion des spores n'a le plus souvent qu'un rayon limité, et est invoquée comme facteur premier dans l'établissement de nouveaux génets dans de nombreuses études réalisées in situ (KAY & VILGALYS 1992, FRANKLAND *et al.* 1995, MARÇAIS *et al.* 1998).

Vraisemblablement, la rencontre de deux mycélia primaires sexuellement compatibles n'est pas un événement rare. Les mycélia monocaryotiques ne sont trouvés in situ que si spécifiquement recherchés (ANGWIN & HANSEN 1993), et sont probablement éphémères, croissent plus lentement et établissent difficilement la mycorhize (LAMHAMEDI *et al.* 1990). Les monocaryons étant rapidement dicaryotisés dans la nature (ETHERIDGE & CRAIG 1976), l'incompatibilité sexuelle ne semble pas être un événement limitant (FRANKLAND *et al.* 1995).

Ainsi, on a pu constater que certaines espèces étaient capables de coloniser de grandes surfaces très rapidement, à de multiples reprises : *Heterobasidion annosum*

profite des coupes rases, et colonise les souches fraîchement coupées: jusqu'à 4800 "individus" par hectare ont été recensés un an après une coupe rase (SWEDJEMARK & STENLID 1993). Quelles sont les dimensions minimales que le mycélium doit atteindre pour pouvoir fructifier ? Probablement, celles-ci varient en fonction de l'espèce considérée, et aussi de la plante hôte. De plus, certaines conditions à l'interface entre le sol et l'air peuvent empêcher la fructification, comme un couvert herbacé trop dense, une humidité insuffisante, etc. (VAN DER HEIJDEN 2000).

Si la reproduction sexuée par des spores se dispersant à courte distance était l'unique mode de propagation des Hyménomycètes ectomycorhiziens, on ne trouverait que des populations structurées en génets apparentés, regroupés spatialement. Or, les tableaux 2 et 3 montrent que l'on trouve des populations structurées en génets immenses, dans lesquelles la reproduction sexuée semble être un événement rare. Pour comprendre ce phénomène, il faut regarder de plus près les différents modes de croissance végétative et de persistance dont ces champignons disposent (voir aussi § 5.1.3 et 5.1.4).

Toutefois, il convient de mentionner qu'il existe d'autres possibilités de variations génétiques en dehors de la reproduction sexuée chez les Hyménomycètes. (PONTECORVO 1954 in CATEN 1980) avait observé qu'une fusion de deux noyaux différents, suivie d'une recombinaison pendant la mitose pouvait générer des nouvelles combinaisons génétiques, à l'instar d'une méiose, chez un champignon filamenteux (*Aspergillus nidulans*). Ce phénomène, observé chez d'autres espèces, a été nommé parasexualité. Sa connaissance est largement dérivée de l'application de techniques de laboratoire, et peu d'observations sont venues confirmer que la parasexualité intervient comme source de variation génétique dans la nature, sans qu'on puisse préciser sa fréquence. De plus, les Hyménomycètes semblent être moins concernés que les espèces privilégiant la reproduction asexuée (CATEN 1980).

Les mutations somatiques peuvent aussi être une source de diversité, comme l'a révélé l'analyse de la diversité génétique d'*Hebeloma cylindrosporum* (GRYTA *et al.* 2000). Même des sporophores peuvent être constitués temporairement par une mosaïque génétique, comme l'ont constaté (PEABODY *et al.* 2000) pour une armillaire.

5.2.3.2 Taille de la population

Le Tableau 2 montre quelques exemple de tailles d'"individus" recensées, selon leur type nutritionnel et l'habitat (les champignons ectomycorhiziens sont traités dans le Tableau 3). Chez les décomposeurs de litière, le diamètre maximal varie de 0.7 m chez un Marasme à 150 m chez *Tricholomopsis platyphylla* (= *Megacollybia platyphylla)*. Nous remarquerons que cette dernière espèce forme des rhizomorphes particulièrement développés, visibles à l'œil nu.

Dans les études citées dans le Tableau 2, les champignons vivant sur les troncs forment des génets supérieurs au mètre. Probablement le moment de la récolte influe sur les résultats, puisque ces espèces forment des sporophores persistants, capable de

sporuler plusieurs années de suite, mais seulement après avoir colonisé un volume important de bois.

Dans les champignons non mycorhiziens colonisant les racines, les armillaires sont connues pour former des génets très étendus, allant de 30 à 600 m, selon l'espèce et l'habitat considérés. Ce genre forme des rhizomorphes extrêmement efficaces pour la croissance rapide, l'infection de nouvelles racines et la translocation des ressources. En Afrique du sud, un très grand génet d'*Armillaria mellea*, phylogénétiquement proche des souches européennes, pourrait être âgé de 108 à 575 ans, et aurait été introduit par le biais d'arbres importés en pots des Pays-Bas au milieu du 17^{è} siècle (COETZEE *et al.* 2001), ce qui prouverait que les génets peuvent survivre à plusieurs générations d'arbres. D'autres champignons des racines, comme *Collybia fusipes*, semblent privilégier la reproduction par les spores, puisque l'on trouve plusieurs génets de taille réduite autour des chênes (MARÇAIS *et al.* 1998).

Chez certains champignons saprophytes ou parasites, la persistance est limitée par l'épuisement du substrat : on observe donc une succession * d'espèces, parasites, saprophytes primaires puis secondaires, dégradant les composés libérés par l'espèce précédente (FRANKLAND 1998). Certains champignons saprophytes ont pourtant la capacité de persister plusieurs années, en ralentissant fortement leur croissance pendant la mauvaise saison (DOWSON *et al.* 1989), ou en développant des rhizomorphes leur permettant de migrer vers des nouveaux substrats (COETZEE *et al.* 2001).

Ces différences de stratégies semblent donc liées aux caractéristiques fonctionnelles des mycélia, comme celles décrites par OGAWA (1985), exposées au § 5.3.2. Le parallèle avec les espèces ectomycorhiziennes pourrait être tenté, puisque nous verrons au § 5.4.2 que certaines espèces ne forment que des mycélia éphémères, alors que d'autres persistent pendant des décennies.

Tableau 2 : Taille d'"individus" d'Hyménomycètes saprophytes, selon leur type de stratégie nutritionnelle et leur habitat. Tiré de HANSEN & HAMELIN (1999) et modifié.

Espèces	croissance végétative	habitat	étendue (m) *	Etude
champignons de la litière				
Marasmius androsaceus		litière d'aiguilles	0,7	Holmer et Stenlid, 1991
Mycena galopus	hyphes	litière d'aiguilles	2,5	Frankland *et al.*, 1995
Pleurotus ostreatus	hyphes	troncs couchés	1	Kay et Vilgalys, 1992
Clitocybe nebularis	cordons mycéliens	litière de feuilles	60	Dowson *et al.*, 1989
Megacollybia platyphylla	rhizomorphes	litière de feuilles	150	Thompson et Rayner, 1982
champignons des troncs				
Fomitopsis cajanderi	hyphes	Douglas	3,5	Adams et Roth, 1969
Phellinus igniarius	hyphes	bouleau	4,5	Verrall, 1937
Phellinus pini	hyphes	Douglas	14	Dreisbach, 1997
champignons des racines				
Armillaria cepistipes	rhizomorphes	hêtre	135	Legrand *et al.*, 1996
Armillaria ostoyae	rhizomorphes	forêt de hêtres	210	Legrand *et al.*, 1996
Armillaria gallica	rhizomorphes	plantation de conifères	290	Legrand *et al.*, 1996
Armillaria bulbosa	rhizomorphes	forêt de feuillus	635	Smith *et al.*, 1992
Armillaria calvescens	rhizomorphes	forêt de feuillus	31	Worrall, 1994
Armillaria gemina	rhizomorphes	forêt de feuillus	36	Worrall, 1994
Armillaria mellea	rhizomorphes	chênes	345	Coetzee *et al.*, 2001
Heterobasidion annosum	mycélium ectotrophique	jeunes épicéas	5	Swedjemark et Stenlid, 1993
Heterobasidion annosum	mycélium ectotrophique	épicéas âgés	30	Stenlid, 1985

* *distance maximale entre les sporophores les plus éloignés.*

5.2.3.3 Croissance et fragmentation du mycélium

Les taux de croissance du mycélium varient fortement entre espèces, mais aussi en fonction du milieu. Il semblerait que les vitesses de croissance soient plus importantes in situ qu'en boîte de Pétri, comme l'ont démontré (DOWSON *et al.* 1989) pour *Clitocybe nebularis*. Des taux approximatifs de croissance des champignons du bois varient de quelques cm à peut-être un mètre par an (BOYCE 1961), ceux de d'*Armillaria bulbosa* pouvant atteindre 2 m par an (SMITH *et al.* 1992). La croissance d'un champignon de la litière a été mesurée, elle est moyenne de 0.9 m/an pour *Clitocybe nebularis* (DOWSON *et al.* 1989).

Chez les champignons mycorhiziens, la croissance de *Laccaria* spp. varie entre 0,2 m/an (DE LA BASTIDE *et al.* 1994) à 1,1 m/an (SELOSSE *et al.* 1999). Une croissance de 0,2 à 0,5 m/an rend compte de la surface occupée par des génets de *Suillus* spp. (BONELLO *et al.* 1998, DAHLBERG & STENLID 1990).

Le plus communément, la croissance est limitée par des obstacles physiques, les limites du biotope, ou par le contact avec d'autres espèces ou des génets incompatibles de la même espèce. Les fronts de croissance, fortement polarisés, s'arrêtent lorsqu'ils rencontrent de tels obstacles (DOWSON *et al.* 1989). En fonction de la taille de l'obstacle, la croissance est réorientée pour le contourner ou s'arrête, au bénéfice des zones adjacentes qui continuent à croître, en laissant un vide.

Les génets étendus et âgés sont supposés se fragmenter en ramets *, c'est-à-dire en génets identiques mais sans connexions entre eux (DAHLBERG & STENLID 1995). Cette fragmentation est difficile à prouver sur le terrain, les structures hyphales de connexion pouvant passer inaperçues.

5.2.3.4 Variations physiologiques

ALLEN *et al.* (1995) suggèrent que la physiologie et la génétique des espèces des champignons, ainsi que leur réponse aux plantes et à l'environnement, régulent leur diversité. Le rôle physiologique de chaque espèce mycorhizienne peut varier en fonction de l'environnement, et dans chaque environnement ces rôles peuvent être assumés par différentes espèces fongiques.

Des différences intraspécifiques ont été constatées, principalement lors d'expériences in vitro, dans des aptitudes diverses, comme la croissance du mycélium, les interactions hôte champignon, l'utilisation des ressources, l'activité enzymatique, la sensibilité aux métaux lourds (cf. CAIRNEY 1999). En fait, cette variabilité intraspécifique peut être aussi importante que la variabilité interspécifique (DEBAUD *et al.* 1995). Elle concerne aussi la virulence infectieuse (BURGESS *et al.* 1995).

Sur *Salix repens*, aucune des 11 espèces ectomycorhiziennes présentes n'exerçait l'éventail complet des bénéfices mycorhiziens (VAN DER HEIJDEN 2000). Au contraire, certaines privilégiaient la stratégie de "manipulation des racines" (la plante augmente rapidement la biomasse de ses racines), alors que d'autres utilisent celle de "remplacement des racines", en développant un réseau mycélien étendu, cette dernière stratégie étant plus efficace dans le transfert d'azote vers la plante. Non seulement les différentes espèces fongiques, mais aussi les différents génets en présence sur le même système racinaire contribuent de manière particulière aux bénéfices de la symbiose pour la plante. Cette diversité pourrait favoriser l'adaptation des plantes aux changements environnementaux (MARTIN *et al.* 1994).

D'autre part, des variations saisonnières ont aussi été constatées, car la demande de la plante en phosphore ou azote varie au cours de la saison, avec des besoins accrus de phosphore durant la floraison (*Salix repens*, (VAN DER HEIJDEN in press-b) ou la

S.C.D. - U... NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

formation des fruits (*Fragaria x ananassa*, DUNNE & FITTER 1989, in VAN DER HEIJDEN 2000). La baisse de la demande en phosphore est accompagnée par une décroissance de la colonisation endomycorhizienne (VAN DER HEIJDEN in press-b).

La fructification de *Laccaria bicolor* et *Laccaria laccata* semblerait être déterminée génétiquement, car des différences de la phénologie entre génets du même site ont pu être observées, certains fructifiant systématiquement plus tard que d'autres (SELOSSE *et al.* 2001).

5.2.3.5 Interactions entre champignons

Chaque racine est associée à une mosaïque d'espèces différentes, de génets différents, voire, dans certains cas, de types mycorhiziens différents (TAYLOR *et al.* 2000, VAN DER HEIJDEN 2000, PEROTTO *et al.* 1996). La diversité spécifique peut varier entre les trois-quarts des racines observées colonisées seulement par un ou deux espèces (en fait, ce sont des morphotypes qui ont été observés, ce qui peut correspondre parfois à un taxon de rang plus élevé que l'espèce), ou un morphotype ne colonisant jamais plus de 20% de la racine (TAYLOR *et al.* 2000).

Une compétition entre les endo- et les ectomycorhiziens avait été supposée chez les plantes susceptibles d'héberger les deux types symbiotiques. Les ectomycorhizes, bien que plus abondantes, seraient des compétiteurs plus faibles que les endomycorhizes (CHILVERS *et al.* 1987). Une interaction négative, supposée par LODGE (1989), n'a pas été observée dans l'étude sur *Salix repens* par VAN DER HEIJDEN (2000). En effet, une inoculation simultanée d'endo- et ectomycorhizes sur les racines de cet arbre n'a pas donné lieu a une suppression mutuelle, ce qui explique que les deux types puissent coexister sur les racines. Par contre, l'inoculation séquentielle favorise la symbiose endomycorhizienne si *Glomus mosseae* est placée en premier (VAN DER HEIJDEN 2000).

Des variations saisonnières ont été constatées, aussi bien dans l'abondance relative des types mycorhiziens, que dans la composition spécifique des ectomycorhizes. Ainsi, VAN DER HEIJDEN (2000) montre que l'abondance des endomycorhizes versus les ectomycorhizes, ainsi que celle de certaines espèces ectomycorhiziennes varie durant la saison.

Le groupe hétérogène mais ubiquiste des endophytes racinaires - *dark septate endophytes* - coexiste avec les endo- et ectomycorhizes, mais a été trouvé aussi sur des racines non mycorhizées. Sa fonction écologique n'est pas encore claire, d'ailleurs peu d'espèces ont été identifiées - toutes celles qui l'ont été jusqu'à présent sont des Ascomycètes. Certaines espèces sont parasites, d'autres saprophytes, d'autres mycorhiziennes. Leurs interactions avec les mycorhizes sont inconnues (JUMPPONEN & TRAPPE 1998).

La compétition de deux saprophytes exploitant le même substrat a été disséquée avec précision par FRANKLAND *et al.* (1995), et nous tentons d'en restituer les grandes lignes. *Mycena galopus* et *Marasmius androsaceus* croissent côte à côte sur la litière

de feuilles. Cette dernière espèce possède un potentiel de croissance et de décomposition de la litière plus important, elle est par conséquent plus compétitive.

Les auteurs ont constaté une stratification verticale des mycélia, le marasme occupant la couche la plus superficielle de la litière, alors que la mycène se trouve juste en dessous. Or, en présence du marasme, la zone de croissance de la mycène se voit repoussée vers le bas. Il semblerait que la croissance du marasme en surface soit rendue possible par ses capacités de résistance à la dessiccation, ce qui présenterait l'avantage d'échapper ainsi à une espèce de collembole mycophage, qui ne peut pas survivre en surface.

Les interactions compétitives ont été évaluées entre trois espèces ectomycorhiziennes inoculées dans divers sites expérimentaux par MCAFEE & FORTIN (1986). Par des index de colonisation et de compétition, ils attribuent à *Laccaria bicolor* la palme du meilleur colonisateur, sauf dans la forêt de pins non perturbée, alors que *Rhizopogon rubescens* était le meilleur colonisateur dans ce milieu, mais aussi le meilleur compétiteur dans tous les milieux. *Pisolithus tinctorius* était un piètre colonisateur dans ces conditions, et n'était pas compétitif avec les espèces indigènes, sauf sur sol dénudé et stérilisé avant la plantation.

D'autres associations entre ectomycorhiziens ont été constatées in situ, sans que leur nature (simple succession, parasitisme ou symbiose) ait pu être spécifiée. Ainsi, *Gomphidius roseus* forme une association intime au niveau des racines de pin avec *Suillus bovinus*, et on ne trouve pas le premier sans le second (OLSSON *et al.* 2000). La morille ne formerait d'ectomycorhizes que secondairement à l'infection d'un hétérobasidiomycète (BUSCOT 1994). Ces citations de cas particuliers ne permettent pas de tirer des conclusions générales, mais nous laissent entrevoir la complexité des interactions possibles.

5.2.3.6 Interactions avec les autres organismes du sol

Au niveau de la rhizosphère, les interactions entre les mycorhizes et les autres organismes du sol sont peu connues, en raison des innombrables facteurs à prendre en compte, comme la diversité des organismes présents (bactéries, virus, microfaune d'arthropodes et de nématodes) et les différents niveaux trophiques (bactéries, prédateurs, super prédateurs).

On peut tout d'abord distinguer les interactions allélopathiques des interactions directes. Aussi bien les micro-organismes que les racines présentes dans le sol peuvent sécréter des molécules organiques, aux effets divers (GRAYSTON *et al.* 1996). Les mycorhizes elles-mêmes libèrent de telles substances, agissant à la fois sur les racines (hormones végétales) et les autres micro-organismes. Les substances organiques sécrétées par les racines nourrissent la microfaune et les bactéries, mais des antibiotiques agissent négativement sur les bactéries.

Au niveau des interactions directes, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que les mycorhizes favoriseraient l'activité biologique du sol, par l'accroissement du rapport C:N (CROMACK *et al.* 1988). Or, l'étude en microcosme, à court terme, avec des

organismes répartis dans trois niveaux trophiques (bactéries, nématodes bactériophages, nématodes mycophages, nématodes prédateurs) n'a pas pu constater un accroissement de la biomasse des organismes étudiés. Seule la biomasse des nématodes mycophages a augmenté. Les mycorhizes semblent agir comme un puits de carbone, plutôt que comme une source (SETÄLÄ *et al.* 1999). Les auteurs mettent cependant en garde contre la généralisation abusive de tels résultats limités au microcosme et dans le temps, qui méritent d'être confirmés in situ et à long terme.

En admettant que les mycorhizes favorisent la microfaune du sol, par le biais de l'enrichissement du rapport C:N du sol (CROMACK *et al.* 1988), il conviendrait de considérer l'augmentation concomitante des consommateurs et des prédateurs. On peut relever les organismes qui se nourrissent d'hyphes, essentiellement des arthropodes (EISFELDER 1970), dont des insectes comme les collemboles (FRANKLAND *et al.* 1995, GANGE 2000), mais aussi d'autres invertébrés (nématodes, mollusques, etc.) (BRUNS 1995).

Parmi les protistes, certains myxomycètes se nourrissent de spores et d'hyphes, et deux espèces fréquentes dans les sols, *Physarum polycephalum* et *Badhamia utricularis* semblent être principalement mycophages (STEPHENSON & STEMPEN 1994). Par contre, certains de ces organismes mycophages pourraient jouer un rôle dans la dispersion des spores, voire la création de micro perturbations favorables à l'implantation de nouveaux mycélia, et par conséquent favoriser les champignons.

FRANKLAND (1998) a pu mettre en évidence comment la préférence d'un collembole pour une espèce saprophyte par rapport à une autre modifiait la répartition verticale des mycélia et l'abondance réciproque de ces espèces.

Quant aux bactéries rhizosphériques, il est admis que certaines bénéficient de la présence des ectomycorhizes (OSWALD & FERCHAU 1968), alors que des données plus récentes suggèrent que certains champignons ectomycorhiziens puissent en réduire l'activité (OLSSON *et al.* 1996). La présence de bactéries endosymbiotiques des mycorhizes a été constatée par BUSCOT (1994) chez *Morchella elata*, tandis que GARBAYE (1994) a démontré que *Laccaria laccata* vit en symbiose avec des bactéries "auxiliaires" extra- ou intra-hyphales.

Les bactéries accroissent considérablement la croissance du mycélium. Les modes d'actions sont inconnus, mais GARBAYE (1994) suppose des effets sur la réceptivité de la racine, sur la reconnaissance plante-champignon, sur la composition du sol et sur la germination des spores. *Laccaria bicolor* exerce une sélection indirecte sur différentes variétés de *Pseudomonas fluorescens*, puisque l'on trouve essentiellement les variétés de cette bactérie utilisant le tréhalose, sucre accumulé dans le mycélium de *L. bicolor*, dans la mycorhizosphère (FREY *et al.* 1997). La présence de bactéries endosymbiotiques a été aussi révélée chez les endomycorhizes, la famille fongique des Gigasporacées étant associée à des bactéries du genre *Burkholderia* (BIANCIOTTO *et al.* 2000).

5.2.4 Facteurs environnementaux

Les perturbations à grande échelle de l'environnement ont en général un effet réducteur sur la diversité des communautés. Cependant, les perturbations des successions primaires de la végétation peuvent créer des "fenêtres d'opportunité" pour des espèces pionnières, qui sont condamnées à disparaître des milieux climaciques.

5.2.4.1 Coupe rase

Une coupe rase de la forêt n'entraîne pas la disparition des espèces ectomycorhiziennes à moyen terme, si on laisse la forêt se régénérer naturellement, mais modifie de manière significative la composition spécifique, les parcelles en forêt et en coupe rase n'ayant plus que 9 % d'espèces en commun. Ces données ont été obtenues en analysant les ectomycorhizes dans des échantillons de sol. Les coupes rases dataient de 8 ans auparavant, les parcelles étaient déjà recolonisées par des jeunes pins, de la même espèce que la forêt adjacente (BYRD *et al.* 2000).

Les clairières, étudiées par la même méthode quatre ans après leur formation, montrent une réduction de morphotypes recensés de 40% par rapport à la forêt environnante (KRANABETTER & WYLIE 1998). Ces résultats sont confirmés par MAH *et al.* (2001), qui constatent que la diversité des morphotypes est plus importante chez les jeunes conifères croissant naturellement en forêt que sur ceux croissant ou plantés dans une coupe claire (MAH *et al.* 2001).

5.2.4.2 Feu

Les effets du feu ont été relativement plus étudiés, essentiellement pour savoir quels sont les propagules de champignons résistants aux incendies, et la dynamique du rétablissement du cortège fongique. Les spores sont les propagules résistantes pour les espèces hypogées, comme *Rhizopogon*, qui dominent d'ailleurs le cortège d'espèces recolonisatrices, d'après les observations de BAAR *et al.* (1999). D'autres espèces, présentes avant l'incendie, pourraient s'être propagées par le mycélium, à partir des racines mourantes vers les jeunes pins. La dessiccation des propagules présentes dans le sol et leur culture avec des pins donne les même espèces dominantes qu'après l'incendie : ce serait la capacité de résistance à la sécheresse de leurs propagules qui caractériserait les espèces pionnières des places à feu (TAYLOR & BRUNS 1999).

Les feux de basse intensité, n'affectant pas l'humus en profondeur et autorisant la survie des arbres âgés, semblent n'exercer que peu d'impact sur les communautés ectomycorhiziennes, comme cela a été observé dans les forêts boréales de Suède (JONSSON *et al.* 1999b, MAH *et al.* 2001).

5.2.4.3 Submersion

Si l'on observe les mycorhizes de *Salix repens*, le manteau hyphal et le mycélium extraracinaire disparaissent en cas de submersion, alors que des fractions du réseau

de Hartig peuvent survivre et se développer lorsque les conditions sont redevenues normales. Les endomycorhizes survivent mieux que les ectomycorhizes (VAN DER HEIJDEN 2000). Le cas de *Telephora terrestris*, qui survit en terrain submergé grâce à ses rhizomorphes (COUTTS & NICHOLL 1990a) a déjà été évoqué au § 5.1.4, page 19.

5.2.4.4 Type de sol et d'humus, effet du champignon sur le sol

La stratification verticale des mycorhizes a déjà été décrite au § 5.1.6, page 21. Nous ne mentionnons ici que les études portant sur la diversification ou l'appauvrissement des communautés lors de modifications du sol.

La couche herbacée que l'on trouve dans les forêts claires peut empêcher la fructification de mycélia présents dans le sol : c'est la conclusion avancée par BAAR *et al.* (1994), qui ont constaté une augmentation de 1,5 de la fructification des champignons, après avoir enlevé la litière et la forte couverture de *Deschampsia flexuosa* qui était présente.

La qualité de la litière (aiguilles ou feuilles) influence la structure de la communauté ectomycorhizienne et l'activité métabolique de la mycorhize, comme cela a été démontré par CONN & DIGHTON (2000). Une corrélation a été trouvée entre les variations de pH et de concentration de phosphore dissous et la diversité spécifique, alors que la diversité générique était corrélée au pH et à l'humidité (VAN DER HEIJDEN in press-a).

Les champignons mycorhiziens eux-mêmes agissent sur le sol : ce fait est aisément compris si l'on considère la masse représentée par les mycélia, qui peut atteindre, dans le cas particulier des communautés d'espèces mycorhiziennes formant des tapis mycéliens («*mats*»), une biomasse équivalente à la moitié de la masse du sol auquel elles sont associées (GRIFFITHS & CALDWELL 1992). Dans les sols colonisés par des tapis mycéliens (sans que les espèces présentes soient détaillées par les auteurs), le rapport C:N est augmenté, ce qui pourrait provenir du prélèvement d'azote organique par le champignon, comme du déversement de composés organiques possédant un rapport C:N élevé.

Ces composés pourraient provenir de la dégradation de complexes humiques du sol, prouvée par la présence d'enzymes susceptibles de jouer ce rôle dans les sols colonisés par les mycorhizes (cellulases, péroxydases, phosphatases, protéinases) (GRIFFITHS & CALDWELL 1992). Il est connu qu'une partie du carbone atmosphérique fixé par les arbres est relâchée dans le sol, par la respiration cellulaire des racines et des mycorhizes, ainsi que par les exsudats racinaires. HÖGBERG *et al.* (2001) ont pu évaluer la respiration des mycorhizes à la moitié de la respiration totale du sol forestier boréal.

De plus, il a été constaté que les hyphes de champignons, supposés ectomycorhiziens, pénètrent directement dans les roches (feldspath et hornblende), en formant des pores de 3 à 10 µm par l'exsudation d'acides organiques. Le calcium et le magnésium, sous formes de complexes contenant de l'aluminium, seraient ainsi rendus accessibles aux

plantes (JONGMANS *et al.* 1997). L'oxalate sécrété par le tapis mycélien est supposé jouer un rôle dans la dissolution du mica (PARIS *et al.* 1996).

Mais les capacités protéolytiques varient entre espèces, et (ABUZINADAH & READ 1986) ont montré qu'une répartition spatiale et temporelle intervenait en fonction de ces capacités.

5.2.4.5 Effets anthropiques, pollution atmosphérique

Les écosystèmes forestiers sont exposés de manière croissante aux multiples impacts anthropiques, qui vont de la suppression pure et simple des biotopes à leur modification, plus ou moins intense, soit par l'introduction de nouvelles espèces, soit par des dépositions polluantes multiples (VITOUSEK *et al.* 1997).

Le **milieu urbain** influence négativement la diversité des champignons ectomycorhiziens, notamment en raison des dépositions azotées (BAXTER *et al.* 1998). En effet, la déposition par les eaux pluviales d'oxydes d'azote rejetés dans l'atmosphère (NO_x) sous forme de nitrates est un phénomène récent et croissant.

L'effet des **dépositions d'azote** a été invoqué pour expliquer le recul de la macrofonge ectomycorhizienne observé à maintes reprises en Europe (ARNOLDS 1991, BOUJON 1997, TAYLOR *et al.* 2000, STRAATSMA *et al.* 2001). Des expériences de fertilisation ont démontré que des adjonctions de nitrates pouvaient conduire à une réduction des mycorhizes (pour une revue, voir WALLENDA & KOTTKE 1998). L'azote minéral réprime la production de phytohormones par les ectomycorhiziens (NYLUND 1988).

Une étude le long d'un transect Nord-Sud en Europe, selon un gradient décroissant de dépositions azotées, montre une réduction spécifique et une diminution des espèces ectomycorhiziennes versus les saprophytes, corrélée avec l'augmentation des dépositions azotées, dans les forêts de *Picea*. Par contre, les forêts de *Fagus* ne sont pas affectées (TAYLOR *et al.* 2000).

Une étude récente, qui donne une vision plus complète en observant les ectomycorhizes en plus des sporophores, confirme les résultats connus sur la diminution de la diversité spécifique analysée par les fructifications, bien que cette situation soit moins marquée, à court terme, au niveau des mycorhizes. Certains genres semblent particulièrement affectés, comme *Russula* (PETER *et al.* 2001).

Les **pluies acides**, dont l'impact a diminué dans nos régions depuis les années 70, peuvent diminuer aussi bien l'abondance que la diversité. (KOWALSKI 1987) a montré, dans une région fortement agressée par la pollution industrielle, que le cortège normal des ectomycorhiziens est perdu avant la mort des arbres, alors qu'il est remplacé par des champignons non identifiés, ne formant qu'un réseau mal développé autour des racines. La pluie acide a comme effet secondaire de solubiliser des éléments inertes dans le sol, comme l'aluminium, avec des effets délétères sur les mycorhizes (LAST *et al.* 1983).

Pour contrecarrer l'acidification du sol dans le Nord de l'Europe, l'adjonction de **calcaire** a été préconisée. Ses effets sur les communautés ectomycorhiziennes n'ont pas pu être clairement démontrés par l'étude de trois pessières traitées par des taux croissants de dolomite (JONSSON *et al.* 1999c). La disparition d'espèces acidophiles et une modification des abondances spécifiques sont cependant présumées, en accord avec des précédentes études (ANDERSSON & SÖDERSTRÖM 1995).

Il est connu depuis 25 ans que les champignons sont capables de concentrer sélectivement les **métaux lourds** (STIJVE 2001). La recherche se focalise sur les dangers potentiels des champignons comestibles ou leur utilisation comme bioindicateurs (MJESTRIK & LEPSOVA 1991), ainsi que sur la physiologie (LEYVAL *et al.* 1997). La sécrétion d'acide oxalique par le mycélium s'accroît lorsque la mycorhize est exposée à des métaux lourds ou à des concentrations accrues d'aluminium : le pouvoir chélateur de cette molécule pourrait jouer un rôle protecteur pour l'association mycorhizienne (AHONEN-JONNARTH *et al.* 2000).

Le rôle protecteur des mycorhizes pour la plante a d'ailleurs été avancé (BRADLEY *et al.* 1981).Quant aux effets sur la diversité, il a été prouvé que le plomb, le cadmium et le nickel réduisent la croissance et la colonisation des ectomycorhizes in vitro (McCREIGHT & SCHROEDER 1982, BELL *et al.* 1988). L'effet du plomb a aussi été étudié par CHAPPELKA *et al.* (1991), et il affecte de manière différente les espèces étudiées. Ainsi, la structure spécifique de la communauté pourrait être affectée.

L'utilisation des forêts comme espace de loisirs, conjointement à l'augmentation de la population, entraîne un nombre de plus en plus élevé de promeneurs en forêt. La **cueillette des champignons comestibles**, en l'état actuel des connaissances, ne semble pourtant pas avoir d'impact sur la fructification, alors que le piétinement a un effet négatif sur une espèce en tout cas (EGLI *et al.* 1990).

5.3 Succession des communautés mycorhiziennes

5.3.1 Evolution en fonction de la maturation du peuplement végétal

S'il est bien établi que la répartition des types mycorhiziens est en fonction du climax (cf. § 5.2.2), la question de savoir quelle est la dynamique de la composition spécifique des symbiotes fongiques se pose dans les formations végétales en évolution. L'âge des arbres, la composition et la structure du sol, la disponibilité en nutriments, les formes d'humus, la litière, la fermeture de la canopée, la strate herbacée sont autant de facteurs évoluant avec l'âge du système et susceptibles d'influer sur les micro-organismes du sol.

Il faut distinguer deux types de succession en forêt :

- les successions primaires, c'est-à-dire l'établissement de la forêt ex-novo, sur sol brut de montagne, sur alluvions nouvellement déposées, p. ex.,
- les successions secondaires, résultant de fortes perturbations naturelles ou d'origine anthropiques (coupes rases, incendies, inondations).

En forêt, nous disposons de nombreuses observations effectuées en plantations, c'est-à-dire dans les stades de succession primaire. Ainsi, la succession temporelle des espèces ectomycorhiziennes a été observée par DEACON *et al.* (1983), MASON *et al.* (1982) ainsi que par FLEMING (1983), sur la base des apparitions successives des sporophores autour d'arbres nouvellement plantés. Ils ont proposé un modèle d'évolution de la mycoflore en fonction de l'âge des plantations :

- le stade précoce (early-stage), qui comprend des représentants des genres *Hebeloma*, *Thelephora*, *Laccaria*, *Inocybe*, etc., suivrait la plantation et durerait de quatre à cinq ans.
- le stade tardif (late-stage), où l'on retrouve des représentants des genres *Cortinarius*, *Leccinum*, *Russula*, *Tricholoma*, etc., n'apparaîtrait qu'après cinq, voire dix ou quinze ans.

Basé sur des observations conduites sur *Betula* en plantation expérimentale, ce modèle a été néanmoins étendu aux forêts naturelles, les espèces des stades précoces étant supposées se trouver préférentiellement dans les forêts jeunes, et celles des stades tardifs dans les forêts matures. On peut reprocher à ce modèle d'avoir été élaboré à partir de milieux présentant des conditions pédologiques inconnues dans les écosystèmes naturels et une évolution bien trop rapide. Cependant, une succession semblable, avec quelques variantes, a été établie dans des plantations de deux espèces de *Pinus* en Grande-Bretagne par (DIGHTON *et al.* 1986).

DEACON *et al.* (1983) avancent que les espèces des stades précoces peuvent infecter les jeunes plants de *Betula* dans un sol normal, non stérilisé, alors que celles des stades tardifs n'en sont pas capables. Une infection est obtenue dans tous les cas si le sol a été stérilisé : le potentiel infectieux serait différent dans les deux groupes, les espèces des stades tardifs étant incapables de s'associer aux racines jeunes. Les

BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

espèces ectomycorhiziennes qui s'implantent après des perturbations, donc s'associent à des arbres très jeunes, sont supposées se propager par les spores, alors que les espèces des stades tardifs s'étendraient de manière végétative (FOX 1983).

La dichotomie de ce modèle a été remise en question par l'existence d'espèces multi-stades (multi-stage), pouvant être présentes à tous les stades de développement de la forêt, comme relevé par DANIELSON & PRUDEN (1989), KRANABETTER & WYLIE (1998) et SENN-IRLET & BIERI (1999). Dans cette dernière étude, *Laccaria laccata* a fructifié bien plus abondamment dans les parcelles de forêt âgée que dans les jeunes, alors que cette espèce est considérée comme typiquement colonisatrice - il s'agirait donc d'une espèce multi-stade.

En fait, les variations spécifiques dans la succession temporelle semblent s'aligner sur un continuum plutôt que sur des stades bien définis. Malgré ces divergences, il est indéniable qu'il existe des genres essentiellement liés aux forêts matures, comme *Amanita*, *Cantharellus*, et des genres essentiellement pionniers, comme *Hebeloma* ou *Dermocybe* (SENN-IRLET & BIERI 1999).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène. L'âge du système racinaire comme facteur déterminant a été invoqué à maintes reprises (p. ex. MASON *et al.* 1982), mais infirmé par les observations de FLEMING (1983), qui remarque que des semis plantés à côté de plants adultes sont mycorhizés par les symbiotes de ces derniers, situation reproduisant la régénération naturelle de la forêt. Les semis seraient donc capables de s'associer aux mycélia déjà présents sur le terrain, et prélever les nutriments nécessaires (READ 1991). Dans cette optique de réseau, l'âge d'un arbre isolé ne peut pas revêtir une importance particulière.

D'autres auteurs invoquent les changements induits dans les horizons superficiels du sol, notamment l'épaississement de la litière et l'accroissement de la matière organique à disposition. En ce sens, les espèces des stades précoces seraient capables de proliférer en milieu minéral dépourvu de glucose, alors que celles des stades tardifs profiteraient de cette adjonction (GIBSON & DEACON 1990). Ces derniers pourraient aussi utiliser l'azote protéique du sol (DIGHTON 1991).

L'occurrence des spores dans le sol, de même que leur capacité de germination ont aussi été invoquées, les espèces des stades tardifs ayant une capacité de germination réduite par rapport à celles des stades précoces (LAST *et al.* 1983). L'influence des micro-organismes du sol a aussi été invoquée. Ainsi, les espèces late-stage seraient associées à des bactéries de la rhizosphère qui les aideraient à dégrader les ressources peu disponibles du sol (LAST & FLEMING 1985), ces types d'interactions étant encore largement inconnus.

Dans les forêts naturelles, en absence de catastrophe écologique, la régénération se fait de manière continue. Les jeunes arbres croissant dans ces conditions sont colonisés par les mêmes espèces que les arbres environnants (JONSSON *et al.* 1999a), et non particulièrement par des espèces des stades précoces. Il faut donc se garder d'appliquer le concept d'espèces précoces et tardives aux successions secondaires.

En réponse aux critiques adressées au modèle stades précoces/stades tardifs, plusieurs auteurs préfèrent à ces notions de succession celles de stratégies écologiques, proposant ainsi un parallèle avec les modèles établis pour les plantes (DIGHTON & MASON 1985, LAST *et al.* 1987). Les différences très marquées des comportements reproductifs observées chez divers organismes, ont conduit au concept de "stratégie écologique".

Ces stratégies sont conditionnées par deux composantes de la sélection naturelle, en fonction du milieu (**sélection r et K**) (MACARTHUR & WILSON 1967).

La **stratégie r** indique un taux de reproduction élevé, contrebalancé par une durée de vie faible, une petite taille. La **stratégie K** implique un taux de reproduction faible, allié à une croissance et une durée de vie importantes. Les pressions sélectives r, que l'on trouve dans les milieux instables, favorisent les espèces à stratégie r, car l'accroissement rapide de leurs populations compense la mortalité souvent catastrophique liée à de tels milieux (mais on peut trouver des espèces r dans tous les milieux). Les espèces K favorisent les aptitudes compétitives par rapport aux aptitudes colonisatrices, puisque leurs milieux sont saturés.

De son côté, GRIME (1977) propose pour les végétaux vasculaires un autre modèle : **sélection R** (rudérale), **C** (compétitive) et **S** (tolérante au stress).

En extrapolant ce modèle aux champignons, DIGHTON & MASON (1985) et LAST *et al.* (1987) ont attribué la stratégie rudérale aux espèces des stades précoces, et les stratégies compétitives K ou C et S à celles des stades tardifs. Ces modèles ont l'avantage sur les modèles purement descriptifs de porter l'accent sur les causes des processus dynamiques, la compétition et la sélection.

Toutefois, alors que chez les animaux ces stratégies sont immédiatement observables, par la taille des individus, des populations, et leur mode de reproduction, chez les champignons ectomycorhiziens chacun de ces paramètres doit faire l'objet d'une étude spécifiquement orientée. Ne considérer que ces aspects liés à la biologie de l'espèce peut conduire à sous-évaluer d'autres facteurs du milieu, ou particuliers au mode de vie des champignons, notamment la possibilité d'une croissance indéterminée.

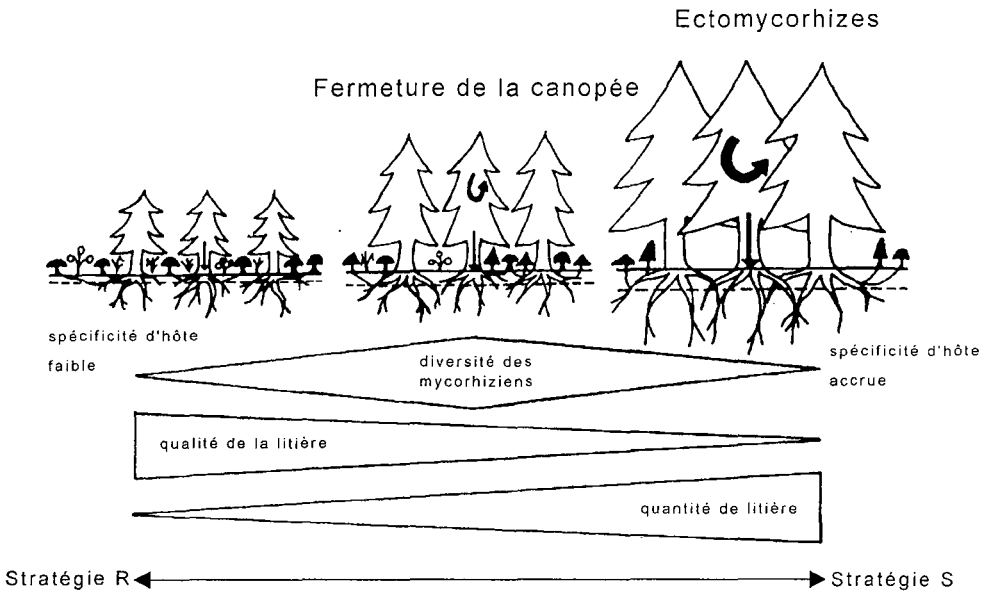


Figure 10 : Successions fongiques en fonction de l'âge de la forêt. Avec la baisse de la qualité de la litière, la sélection favoriserait les espèces adoptant une stratégie S. La stratégie R serait adoptée par des espèces vivant dans des forêts jeunes, peu sélectives quant à leur hôte.
D'après DIGHTON & MASON (1985).

5.3.2 Modèles reliant la succession d'espèces à des caractères fonctionnels des mycélia

NEWTON (1992) met en garde contre la généralisation d'un modèle trop simple, qui ne tient pas compte des différences d'évolution entre écosystèmes distincts, ni de l'influence du sol. Il affirme que la succession des champignons ectomycorhiziens ne doit être attribuée qu'à leur capacité relative de colonisation et propagation à partir d'un inoculum, à l'exclusion de tout autre phénomène. La clé de la compréhension de la succession ectomycorhizienne réside, d'après cet auteur, dans la manière de former le mycélium.

Des caractéristiques fonctionnelles, comme la production de cordons mycéliens ou la capacité de se propager dans le système racinaire par infection secondaire seraient plus appropriées pour décrire la diversité des comportements rencontrés dans les écosystèmes naturels - diversité que le concept de stades précoce et tardif ne peut englober.

NEWTON (1992) distingue deux types d'inocula, à savoir les spores et le mycélium déjà en place, ce dernier s'étendant par infection secondaire, et y associe des espèces utilisant préférentiellement l'un ou l'autre. Dans les forêts nouvellement plantées, l'inoculum sera essentiellement disponible sous forme de spores. Les espèces pionnières (terme plus approprié que celui d'early-stage), sont celles qui se propagent

par ce type d'inoculum, et colonisent les racines en premier. Dans une forêt établie, l'inoculum sera plutôt disponible sous forme de mycélia.

L'infection mycélienne dépendra donc de la capacité de colonisation du mycélium, et non plus de la capacité de germination. Les espèces qui disposent d'un fort potentiel d'infection à partir du mycélium vont prédominer avec le temps.

NEWTON (1992) regrette que les explications apportées à ce phénomène reconnu se soient centrées sur l'âge de la forêt, en négligeant l'importance d'éléments propres aux champignons. De plus, les espèces pionnières, qui ne forment qu'une infime partie des champignons ectomycorhiziens, ont reçu une attention disproportionnée à leur importance relative, il reste donc à inclure dans une classification cohérente les milliers d'espèces restantes.

Puisque le rôle prédominant du mycélium comme facteur d'infection secondaire est admis, c'est dans les caractéristiques fonctionnelles de ce dernier qu'il faut chercher des critères explicatifs. Les cordons mycéliens jouent un rôle important soit comme source d'inoculum, soit comme système de transport d'eau et de nutriments. Or, on ne trouve pas ces cordons dans toutes les espèces ectomycorhiziennes, et certaines espèces pionnières n'en forment pas, comme par exemple *Laccaria* et *Hebeloma*.

La forme de la mycorhize, notamment les branchements, sont invoqués comme cause de l'efficacité de l'invasion des racines adjacentes à la mycorhize. Ainsi, *Cenococcum geophilum*, dont les mycorhizes ne sont jamais branchées, est peu concurrentiel en présence d'autres ectomycorhizes (NEWTON 1992).

L'extension des mycorhizes est évidemment influencée par la disponibilité de radicelles non infectées. Une grande densité de racines devrait par conséquent avantager les espèces se propageant par extension mycélienne. Ceci pourrait expliquer partiellement l'apparition tardive de certaines espèces de champignons, qui ne s'associent qu'avec les parties les plus âgées des racines, à proximité du tronc. Une sensibilité du champignon à l'âge des racines (voir supra) avait été invoquée comme explication. En fait, seule la densité des racines, plus importante à proximité du tronc, serait déterminante, d'après (NEWTON 1992).

Ce même auteur invoque d'autres critères qui permettraient d'affiner le modèle et de prévoir le comportement de chaque espèce : bien entendu, des facteurs climatiques et édaphiques ne peuvent être annulés, ainsi que le spectre d'hôte (large ou étroit), la capacité de transfert de carbone et autres nutriments par le champignon. Pour tous ces critères, les données à disposition sont encore insuffisantes pour construire une classification précise.

OGAWA (1985) a soigneusement observé la structure des mycélia dans le sol, horizontalement et verticalement, pour de nombreuses espèces au Japon. Il a collecté les mycorhizes et estimé la quantité de micro-organismes de la rhizosphère. Malheureusement, la plupart des espèces dont il décrit le comportement nous sont inconnues, ne croissant pas en Europe. Il distingue trois types de colonies mycéliennes :

- le rond de sorcière,
- la surface continue irrégulière,
- les petites colonies dispersées,

ce dernier type étant le plus courant chez les Hyménomycètes. Ces trois types observés ont été divisés en sous types d'après le degré de développement de la mycorhize, du mycélium extraracinaire et des rhizomorphes, ces trois caractères étant associés : les mycorhizes les plus développées, celles qui modifient l'architecture racinaire en augmentant les branchements en des endroits précis, sont associées aux rhizomorphes les plus développés. A l'opposé, les rhizomorphes non différenciés sont associés aux mycorhizes pennées, et n'influencent pas l'architecture racinaire, mais suivent la croissance des racines les long desquelles ils se répartissent régulièrement. L'espace exploré par chaque type diffère aussi, dans le type le moins différencié le mycélium extraracinaire ne s'aventure pas bien loin des mycorhizes horizontalement et verticalement, alors que s'il y a des rhizomorphes importants, ils relient les îlots de mycorhizes coralloïdes entre elles, et ne se limitent pas à l'horizon où se trouvent les racines.

RAIDL (1997) a non seulement étudié la structure des rhizomorphes de 18 espèces, mais aussi leur ontogénie au moyen d'un système permettant l'observation in vivo. Il distingue trois types d'organisation seulement, qu'il associe à la taille atteinte par les mycélia. Deux espèces de *Dermocybe* et *Laccaria bicolor* forment le type le moins différencié, et la taille de leurs mycélia n'atteint que quelques centimètres dans la boîte d'observation. Les systèmes à rhizomorphes différenciés atteignent par contre des tailles plus importantes : de quelques centimètres à quelques décimètres.

Parmi ceux-ci, il distingue deux catégories en fonction de leur degré de différenciation. Les rhizomorphes d'*Amanita muscaria*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma citrinum* et *Thelephora terrestris* forment un réseau dense, mais peu branché. Les rhizomorphes de *Boletinus cavipes*, deux espèces de *Tricholoma* (*T. batschii, T. terreum*) et de quatre espèces de *Suillus*, forment aussi un réseau dans la partie proximale, mais complété par des structures en éventail, dues à de nombreux branchements dans la partie distale.

Les observations d'OGAWA (1985) et de RAIDL (1997) citées ci-dessus se recoupent fortement : on peut présumer, en suivant l'hypothèse de NEWTON (1992), que la taille que les mycélia vont atteindre dans les écosystèmes naturels est étroitement dépendante du degré de différenciation des hyphes, et par conséquent de la complexité d'organisation du mycélium. La durée de leur survie semble aussi être dépendante des même facteurs, notamment de la taille atteinte par le mycélium.

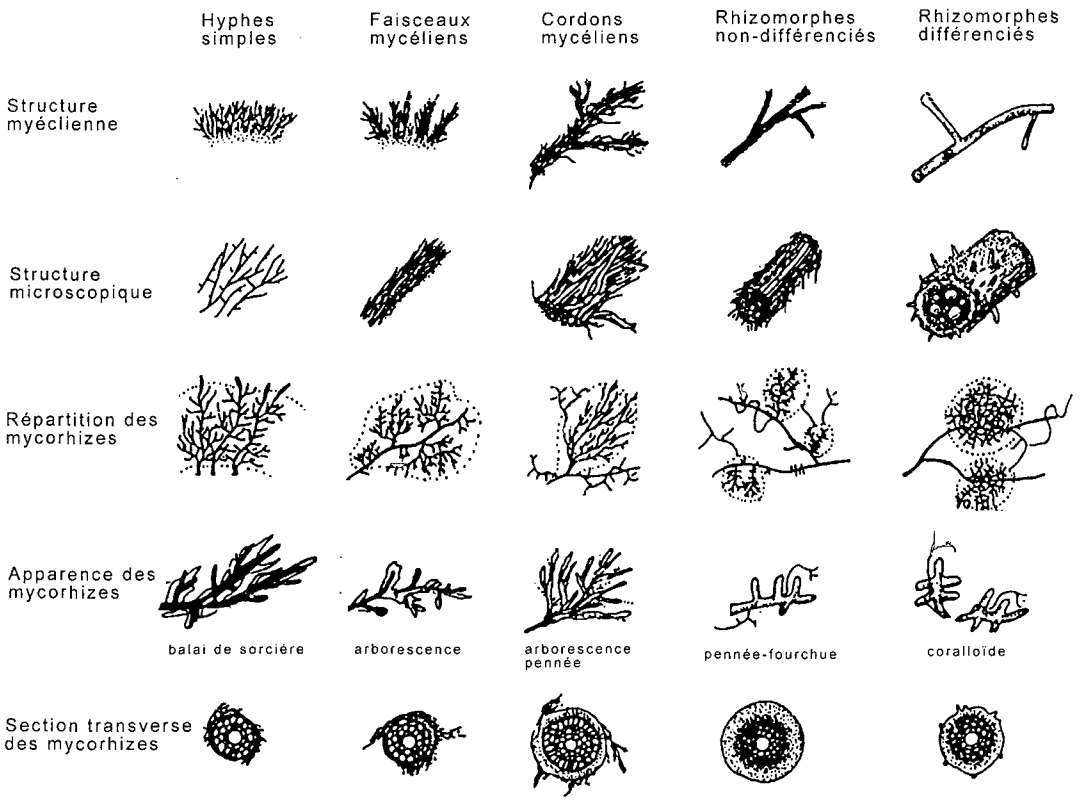


Figure 11 : Les différents types de colonies mycéliennes selon OGAWA (1985).

5.3.3 Modèles reliant les structures génétiques des communautés ectomycorhiziennes aux écosystèmes et à leur évolution.

Dès les premières observations permettant d'élucider la structure génétique des communautés, un parallèle a été tenté avec le modèle des stades précoces et tardifs.

En se référant à la succession early- et late-stage, DAHLBERG et STENLID (1990, 1994) ont émis l'hypothèse d'une corrélation entre la taille des isolats (mycélia distingués sur la base de l'incompatibilité somatique) et l'âge des arbres auxquels ils étaient associés : dans une forêt de 15-20 ans, la taille moyenne des isolats de *Suillus bovinus* (considérée comme une espèce des stades précoces) était de 4.8 m, alors que dans une forêt de 70-120 ans, elle était de 15 m, la taille maximale atteignant 200 m^2.

Le modèle élaboré à partir de ces observations est représenté dans la Figure 12 : la taille des génets croîtrait, alors que leur nombre total décroîtrait suivant l'âge de la station. Une colonisation initiale et multiple par des spores aurait lieu uniquement au stade jeune, suivie d'une croissance végétative pendant laquelle les mycélia génétiquement distincts entreraient en compétition les uns avec les autres, ce qui aboutirait à l'élimination de la plupart d'entre eux.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

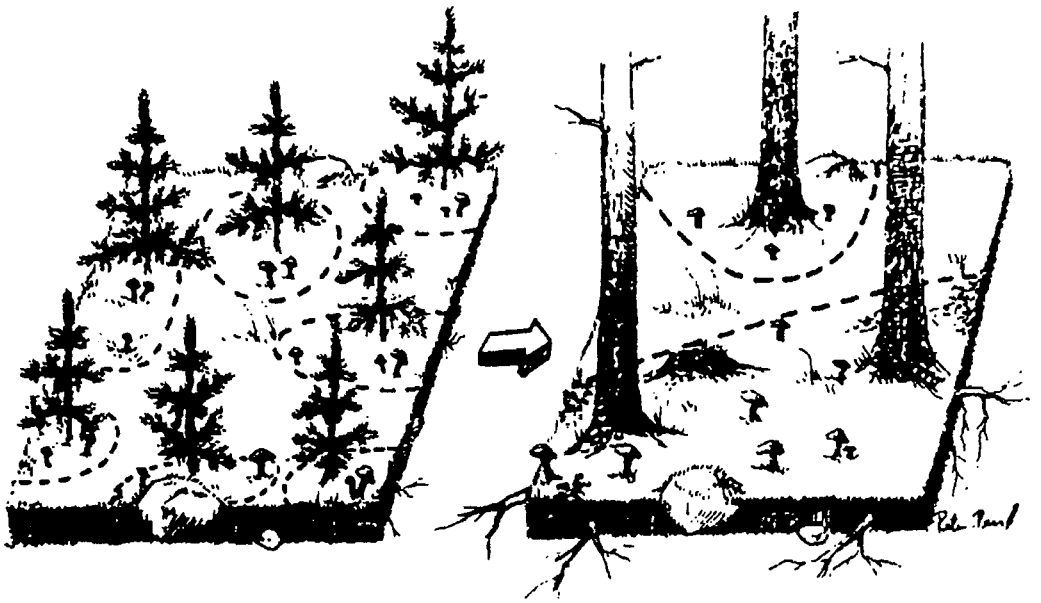


Figure 12 : Evolution schématique d'une population de *Suillus bovinus* avec l'âge du peuplement forestier. Passage d'une population dense de petits génets à une population lâche de génets plus grands (repris de DAHLBERG & STENLID, 1995).

Lorsque DAHLBERG a tenté de confirmer au niveau interspécifique ce modèle en étudiant une espèce considérée comme late-stage, *Suillus variegatus*, il s'attendait à trouver des isolats plus étendus que pour *Suillus bovinus* (DAHLBERG 1997). Dans les pinèdes du Suède, *Suillus variegatus* est le bolet dominant dans les forêts matures, et remplace en abondance *Suillus bovinus* au fur et à mesure du vieillissement. Or, les populations de *Suillus variegatus* dans une forêt de *Pinus sylvestris*, en Suède, âgée de plus de 100 ans, sont constituées par des grands génets (entre 10 et 20 m de distance maximale moyenne) et des petits génets, ne se recouvrant pas. Ces résultats sont similaires à ceux de *Suillus bovinus*.

Ainsi, le modèle établi sur la base des observations sur *Suillus bovinus* ne s'applique pas obligatoirement ni à d'autres espèces du même genre, ni à la succession spécifique. Par contre, la compétition intraspécifique semble être un facteur de structuration important, puisqu'on ne retrouve presque jamais de génets superposés.

Au fur et à mesure de l'avancement des connaissances (voir infra), des évidences s'accumulent suggérant que ce modèle ait été établi de manière prématurée, et qu'il ne peut rendre compte des structures observées dans de nombreux cas. De plus, la taille des isolats a été établie sur la base de l'incompatibilité somatique, méthode abandonnée depuis par la plupart des chercheurs. En effet, cette méthode implique l'isolement en culture du mycélium, ce qui n'est pas possible avec de nombreuses

espèces ectomycorhiziennes, alors que d'autres espèces ne montrent que des réactions d'incompatibilité peu nettes, difficilement interprétables (voir § 5.4.1).

Ayant le mérite de la simplicité, et en l'absence de confirmation ou d'infirmation, c'est le modèle qui a été invoqué dans toutes les études décrivant des populations ectomycorhiziennes jusqu'à présent.

5.4 Génétique des populations ectomycorhiziennes

L'étude des populations naturelles de champignons s'est trouvée confrontée aux questions suivantes :

- quelles sont les unités fondamentales des populations fongiques ?
- quelle importance revêtent les reproductions sexuée et asexuée dans la détermination de la structure génétique ?

La plupart des champignons ne suivent pas les modèles classiques de génétique des populations. Ils ont des méthodes originales de colonisation, dispersion, persistance et leurs générations se superposent. La reproduction sexuée peut être soit irrégulière, soit absente. De plus, leur croissance à l'intérieur d'un substrat solide rend le recensement des individus difficile voire impossible.

Une définition de la population de champignons pragmatique et adaptée à des études sur le terrain a été proposée par ANDERSON & KOHN (1998) : "un groupe d'individus de la même espèce croissant dans la même localité au même moment". Toujours dans la même perspective et selon les même auteurs, l'unité de base de ces populations est le génet, qui doit être identifié de manière sûre par des marqueurs multiloci, définissant des génotypes uniques, dont les chances d'être retrouvés par hasard sont quasiment nulles.

5.4.1 Comment définir les limites "individuelles" du mycélium ?

La capacité des mycélia en croissance de se reconnaître comme soi ou non-soi en cas de rencontre sur un même substrat est appelée **incompatibilité somatique** (WORRAL 1997). La rencontre de deux mycélia compatibles entraîne en général la fusion. Par contre, si les mycélia sont incompatibles, des réactions de rejet, empêchant la fusion et par conséquent l'échange génétique, apparaissent dans la zone de contact. L'intégrité de chaque mycélium est ainsi maintenue.

L'incompatibilité somatique a été exploitée pour définir des "individus" mycéliens, en confrontant des isolats de provenance diverse in vitro. Les guillemets sont justifiés par le fait qu'on ne peut conclure à une identité absolue entre ces deux individus par cette seule méthode (JACOBSON *et al.* 1993).

L'incompatibilité somatique chez les Basidiomycètes est régulée par des gènes situés sur 1 à 4 (parfois plus) loci indépendants, dont au moins certains sont multialléliques (HANSEN & HAMELIN 1999). Deux isolats sont incompatibles si les allèles ne sont pas identiques à un ou plusieurs de ces loci. Les réactions d'incompatibilité se

remarquent à l'œil nu par une zone d'arrêt de croissance, voire de nécrose, ou des modifications des hyphes (pigmentation ou dépigmentation, changement d'aspect (MALIK & VILGALYS 1999). A noter que les réactions d'incompatibilité sont plus difficiles à interpréter chez les champignons mycorhiziens, dont la plupart d'ailleurs ne croissent pas in vitro, comme les Inocybes et beaucoup de Russulacées et de Cortinariacées.

L'utilisation de l'incompatibilité somatique dans le but de définir la position et la taille des mycélia individuels a permis l'émergence de la génétique des populations de champignons, saprophytes (DOWSON *et al.* 1989, KAY & VILGALYS 1992, MARÇAIS *et al.* 1998, FRANKLAND *et al.* 1995) ou parasites (LEGRAND *et al.* 1996) essentiellement, mais aussi mycorhiziens, par les études de DAHLBERG déjà citées sur *Suillus*.

Cependant, (JACOBSON *et al.* 1993) par une étude sur 9 sporophores et isolats de *Suillus granulatus*, ont démontré que l'incompatibilité somatique sous-estime probablement le nombre de génets en présence, par rapport à l'utilisation de la RAPD, qui génère des marqueurs moléculaires multiloci.

La généralisation des méthodes liées à l'amplification de l'ADN dans les années '90 (HENRION *et al.* 1992, GARDES & BRUNS 1991) a permis un grand pas en avant dans la reconnaissance des unités de base des populations. Nous n'aborderons brièvement ici que les méthodes les plus utilisées dans les études récentes, qui seront détaillées dans le § 5.4.2. Ces méthodes sont les suivantes :

1. L'amplification de fragments qui montrent une différence de taille entre taxa. Divers fragments de l'ADN ribosomal (ITS, IGS 1 et IGS2), ont montré des pouvoirs de résolution différents selon les taxa. L'ITS montre un polymorphisme d'au moins 10% entre des espèces du genre *Suillus*, et de 1à 3 % à l'intérieur d'une espèce morphologique du même genre (BRUNS *et al.* 1991). Ces deux séquences non transcrites, par conséquent variables, sont respectivement situées entre les gènes ribosomaux appelés 18S (petite sous-unité, SSU) et 5,8S, pour l'ITS1, et 5,8S et 28S (grande sous-unité, LSU), pour l'ITS2 (Figure 26).

   Chez les champignons, la taille de l'ITS global, gène 5,8S inclus, se situe entre 650 et 900 pb (HORTON & BRUNS 2001). Des amorces spécifiques aux Basidiomycètes ont été mises au point par GARDES & BRUNS (1993). L'IGS 1, espaceur non-transcrit, est connu pour montrer une variabilité intraspécifique, donnée par la présence de courtes séquences répétées, pouvant générer des crossing-over asymétriques (BRUNS *et al.* 1991). On peut ainsi repérer des variations de taille par simple gel d'électrophorèse (HENRION *et al.* 1992).

2. L'analyse d'hétéroduplexes des ITS et IGS de l'ADN ribosomal utilise leur polymorphisme allélique. Il existe, par individu, soit deux allèles identiques, ce qui se traduit par un produit d'amplification unique sur gel d'électrophorèse, soit deux ou trois bandes indiquant la présence de deux allèles de taille différente au même locus (AANEN *et al.* 2001, SELOSSE *et al.* 1996). Une faible différence de taille entre deux allèles peut être révélée par la formation d'hétéroduplexes

dans les gels d'électrophorèse (CAMPBELL *et al.* 1995).

Les fragments identiques mais différents par une insertion, même de quelques bases, s'associent dans le gel, sauf à l'endroit présentant l'insertion, ce qui forme une boucle retardant la migration du double fragment hétéroallélique. Celui-ci apparaît donc dans le gel comme un fragment de très grande taille, en plus des deux fragments homoalléliques qui ont migré selon leur taille réelle. La formation d'hétéroduplexes a été observée chez de nombreux Basidiomycètes, suggérant une occurrence fréquente des hétérozygotes (SELOSSE *et al.* 1996).

3. L'ADN mitochondrial pourrait révéler une autre structure populationnelle que l'ADN nucléaire, puisque les mitochondries ne suivent pas la migration des noyaux lors de la plasmogamie ou de fusion de mycélia compatibles. Cette méthode n'a pas été fréquemment employée pour l'étude des populations. Chez *Hebeloma cylindrosporum* et *Laccaria bicolor* elle a révélé moins de polymorphisme que l'ADN ribosomal (GRYTA *et al.* 1997, SELOSSE *et al.* 1999).

4. La RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), utilise le polymorphisme des sites de restrictions, spécifiques à une ou plusieurs enzymes. On obtient des fragments d'ADN de taille différente. Elle peut s'utiliser sur l'ADN total ou sur des fragments amplifiés au préalable, par exemple l'ITS, l'IGS et l'ADN mitochondrial cités ci-dessus, et augmenter leur pouvoir de résolution. Il ne s'agit pas d'une méthode très discriminante, le polymorphisme obtenu est limité. Référence: ORITA *et al.* (1989).

5. La RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), utilise des amorces courtes (composées d'une dizaine d'oligonucléotides) pour générer, par amplification au hasard, un grand nombre de fragments de taille différente (Figure 26). Plus le nombre de bandes obtenues est élevé, plus le profil a la probabilité d'être unique, propre au génet ainsi identifié. C'est une méthode très discriminante, rapide et relativement peu coûteuse (BONELLO *et al.* 1998, GRYTA *et al.* 2000, SELOSSE *et al.* 1998, 1999). Son pouvoir de résolution est supérieur à celui du séquençage de fragments considérés comme variables, comme l'ITS (HSEU *et al.* 1996).

   Elle ne permet par contre que de mettre en évidence des marqueurs dominants, ce qui exclut toute étude génétique poussée. De plus, elle n'est pas sélective quant à l'ADN amplifié, et ne peut être utilisée directement sur des associations symbiotiques. Référence: WILLIAMS *et al.* (1990).

6. Les SCARs (*Sequence Characterized Amplified Region*) sont une prolongation de la RAPD : un choix de fragments obtenus par RAPD sont séquencés, ce qui permet de les amplifier spécifiquement, puis de comparer les séquences entre elles. Les marqueurs ainsi obtenus sont codominants ce qui permet de différencier les homozygotes des hétérozygotes. De plus, ils peuvent être testés comme amorces spécifiques à un génet donné, et utilisés pour les situer directement à

partir d'échantillons de sol ou sur les mycorhizes. Référence : GANDEBOEUF *et al.* (1997).

7. La MPP (*Microsatellite-Primed PCR*) (ou ISSR : *Inter-Simple Sequence Repeat* ou RAMS : *Random Amplified Microsatellite Analysis*) fonctionne selon le même principe que la RAPD, mais en utilisant comme amorce des séquences de trois ou quatre bases répétées (ex : GCG x 5). Chez les Basidiomycètes, ce type de séquence se trouve réparti dans le génome *, contrairement aux animaux, où elles sont groupées en segments de longueur importante, appelés microsatellites. Le résultat obtenu est semblable à la RAPD. Récemment, des amorces spécifiques à une espèce de *Rhizopogon* ont permis d'amplifier directement l'ADN fongique à partir ectomycorhizes, ce qui laisse ouvre de nouveaux horizons à cet outil de recherche (KRETZER *et al.* 2000). Référence: MEYER *et al.* (1993), MARTIN *et al.* (1998).

8. L'AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphism*), consiste à digérer l'ADN total avec des enzymes de restriction, les fragments obtenus sont ensuite liés à des fragments-amorces et amplifiés. Les différentes tailles des fragments amplifiés sont visualisées par leur fluorescence. Cette méthode génère un grand polymorphisme et produit des marqueurs dominants. Des marqueurs codominants peuvent être obtenus par le séquençage d'un choix de fragments. L'équipement est coûteux et comme c'est une technique relativement récente, elle n'est pas encore très répandue. Référence: VOS *et al.* (1995).

9. La SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) se fait en deux étapes. La première consiste à obtenir des fragments par amplification, que ce soit par la RAPD ou par amplification d'un fragment choisi pour son polymorphisme, comme les espaceurs de l'ADN ribosomal. Seuls les fragments présents dans tous les essais sont amplifiés une deuxième fois. La SSCP consiste alors à faire migrer les fragments, dissociés en deux brins, dans un gel d'acrylamide. La résolution est suffisante pour détecter des mutations d'une seule base. Cette technique génère des marqueurs codominants. Référence: ORITA *et al.* (1989).

10. Le séquençage de fragments choisis, en particulier la petite sous-unité ribosomale, est la méthode la plus employée pour la phylogénie. En génétique des populations, le fragment d'ADN retenu doit avoir un taux de mutation élevé pour montrer un polymorphisme suffisant. Or, même une tentative d'utilisation du séquençage de l'IGS 1 dans des populations de *Paxillus involutus* en pépinière et plantation n'a pas révélé plus de polymorphisme que la RFLP appliquée au même fragment (HÖNIG *et al.* 2000).

    Le séquençage de l'ITS, par des amorces spécifiques aux Basidiomycètes (GARDES & BRUNS 1993) ou aux Ascomycètes permet par contre l'identification des espèces à partir des racines mycorhizées, en comparant les séquences obtenues avec une base de données (PRITSCH *et al.* 2000, PETER *et al.* 2001, GLEN *et al.* 2001). C'est donc un préliminaire important pour des études de génétique des populations basées sur des prélèvements de racines.

Parmi ces méthodes, il convient de distinguer celles qui portent sur un seul locus (1, 2, 3, 9) de celles qui génèrent des marqueurs multiloci (4, 5, 6, 7). Le polymorphisme généré par un seul locus ne permet de distinguer que des haplotypes *. Lorsque plusieurs loci sont impliqués, on peut parler de génets *.

Quelle que soit l'unité de base choisie, des informations utiles peuvent être obtenues sur la structure des populations, en définissant le nombre et la répartition spatiale des haplotypes ou des génets qui la composent. En poursuivant l'étude sur plusieurs années, la dynamique des populations peut être abordée, soit l'établissement, la croissance, la longévité, voire l'extinction des différents génets. Les études menées dans des sites possédant des caractéristiques écologiques différentes permettent de mieux comprendre quels sont les facteurs environnementaux qui influent sur la structure et la dynamique des populations.

5.4.2 Revue des études existantes

La structure des communautés fongiques a pu être élucidée dans quelques cas. DAHLBERG (2001) recense environ 20 études effectuées jusqu'à présent. Il apparaît ainsi que certaines espèces se présentent sous forme de nombreux petits génets à durée de vie courte, alors que d'autres ont la capacité de former des mycélia très étendus pouvant persister des dizaines, voire des centaines d'années. Nous allons passer en revue les résultats des principales études connues, et nous montrerons à quel point il est difficile de constituer une vision générale à partir des ces observations disparates.

Nous avons déjà évoqué les importantes études de DAHLBERG & STENLID (1994) et DAHLBERG (1997) sur deux espèces du genre *Suillus* (§ 5.3.3). La plupart des auteurs cités ci-dessous replacent leurs résultats dans le schéma d'évolution du peuplement forestier, que ce soit pour confirmer ou infirmer le modèle de DAHLBERG et STENLID. De ce fait, nous aborderons en premier les résultats obtenus en plantations, pour passer aux études effectuées en forêts matures.

Dans les plantations, le genre *Laccaria,* utilisé comme inoculum déjà en pépinière (HENRION *et al.* 1994b), s'est avéré capable de persister et donc a été utilisé pour l'amélioration de la croissance des arbres, notamment du pin Douglas en France (LE TACON *et al.* 1992). De LA BASTIDE *et al.* (1994) ont étudié la distribution des génets de *Laccaria bicolor* croissant naturellement autour de trois *Picea abies* pendant deux à quatre ans. Les arbres étaient âgés de quatre ans au moment de leur transfert de la pépinière dans une plantation de résineux au Canada. Le sol avait été fertilisé et traité aux herbicides pendant la durée de l'étude. Les auteurs ont constaté qu'un génet de *L. bicolor* pouvait rester associé avec le système racinaire pendant au moins trois ans en variant sa distribution spatiale. Un seul génet par arbre avait été trouvé. Des mycorhizes de *Telephora terrestris* et *Hebeloma spp* étaient aussi présentes, mais *L. bicolor* dominait apparemment la rhizosphère.

Il est difficile de savoir dans quelle mesure ces résultats peuvent être pris en compte dans le registre qui nous intéresse, puisque le but poursuivi n'était pas le même: il ne s'agissait pas, pour les auteurs, d'étudier la structuration génétique, mais d'observer la colonisation par les ectomycorhizes d'arbres nouvellement plantés. Le rôle probable des traitements, en particulier les fertilisants, dans la sélection des espèces mycorhiziennes n'a pas été abordé. Or, il est bien connu que les apports d'azote influencent négativement l'établissement des mycorhizes, et que certaines espèces sont moins tolérantes que d'autres (cf. 5.2.4.5). Il est permis de se demander si cet apport d'engrais n'a pas diminué la concurrence interspécifique par élimination d'espèces sensibles, favorisant la permanence des génets de *Laccaria bicolor*.

BAAR *et al.* (1994) ont étudié expérimentalement les populations de *Laccaria bicolor* après avoir ôté la litière et l'humus dans des parcelles d'une plantation de *Pinus sylvestris* âgée de 17 ans, établie dans ce qui était auparavant une lande acide aux Pays-Bas. Le but était de savoir si l'augmentation de la fructification consécutive à l'arrachage de l'humus, observée dans une précédente étude (BAAR & KUYPER 1993) trouvait son origine dans des mycélia nouvellement installés ou présents auparavant. Ils ont trouvé des groupes d'incompatibilité somatique comprenant jusqu'à 82 sporophores, d'un diamètre maximal de 12,5 m, mais aussi des petits groupes.

La taille de ces grands groupes d'incompatibilité somatique suggère que les mycélia avaient survécu à l'arrachage de la litière, probablement sous forme de mycorhizes, alors que la présence de petits groupes laisse supposer une colonisation récente par les spores. A nouveau, les conditions expérimentales particulières ne permettent pas la comparaison avec d'autres études.

Le fait qu'une souche de *Laccaria bicolor* inoculée en pépinière puisse rester associée aux racines des arbres pendant plusieurs années a été confirmé par (SELOSSE *et al.* 1999) dans leurs observations sur la plantation expérimentale de St-Brisson (Nièvre). L'analyse par des marqueurs de l'ADN ribosomal et des marqueurs multiloci a été effectuée pendant dix ans sur la souche américaine S238N, inoculée en pépinière sur *Pseudotsuga menziesii,* résineux introduit en France pour la sylviculture. Les auteurs ont pu démontrer que cette souche persistait et fructifiait abondamment pendant cette période, sans autofécondation ni introgression.

Par contre, les arbres voisins, plantés simultanément mais non inoculés en pépinière, ont été colonisés par des nombreux petits génets de *Laccaria bicolor* et *L. laccata*, dont la diversité génétique suggère une origine sporale. Certains de ces génets ont persisté au même endroit pendant deux à quatre ans, sans accroissement notable.

La capacité accrue de persistance des mycorhizes de *Laccaria bicolor* S238N pourrait être une particularité de cette souche, sélectionnée en laboratoire justement pour son potentiel mycorhizogène intact après 18 ans de culture - ce qui n'était pas le cas d'autres souches, isolées à partir du même sporophore (DI BATTISTA *et al.* 1996). La souche européenne 81306 de *L. bicolor*, plantée dans le même site expérimental, a montré une persistance similaire. Dans un seul cas cette souche a envahi une parcelle expérimentale adjacente, en formant un génet de 30,5 m de large,

avec un taux de croissance supposé de 1,1 m par an (SELOSSE *et al.* 1999). La croissance autour des autres arbres inoculés, difficilement évaluable en raison de leur proximité, paraît cependant négligeable.

Une étude présente un cas particulier, celui de *Amanita muscaria* dans une plantation de *Pinus radiata* dans le New South Wales au Sud de l'Australie (SAWYER *et al.* 2001). *Amanita muscaria* n'est pas indigène en Australie et a été introduite en même temps que les pins plantés pour la foresterie, il y a environ 80 ans. L'analyse par ISSR de l'unique récolte réalisée dans trois sites différents montre 8 à 10 génets entremêlés par site (Figure 13). Les mêmes génets sont trouvés dans les trois sites éloignés les uns des autres de 5 à 50 Km.

Pour expliquer ce résultat surprenant, les auteurs invoquent les pratiques de plantation utilisées, qui mettent en contact les racines des plants avec de la litière récoltée auprès d'arbres existants. La répartition spatiale des génets serait donc artificielle, comme le laissent supposer les formes très allongées des génets de la Figure 13. Il s'agirait en fait de clones *.

Cette étude ne peut de ce fait nous éclairer sur la structuration génétique de *Amanita muscaria* - sauf qu'apparemment la reproduction sexuée ne joue pas un grand rôle dans son établissement dans ces conditions non-naturelles, et que la longévité semblerait être d'au moins 36 ans, date des plantations étudiées. Il faut noter que l'amanite tue-mouches n'est apparemment pas confrontée à des compétiteurs sur ces résineux introduits récemment en Australie. Cette situation ne va pas sans rappeler celle de *Laccaria bicolor* introduit en plantation sur le pin Douglas, évoquée ci-dessus.

En résumé, dans les **plantations**, les espèces ectomycorhiziennes de *Laccaria* et *Amanita muscaria*, inoculées en même temps que les plants ou établies naturellement semblent persister de manière durable (De LA BASTIDE *et al.* 1994, BAAR *et al.* 1994, SELOSSE *et al.* 1999, SAWYER *et al.* 2001) par une croissance végétative limitée en général aux systèmes racinaires des plants inoculés (SELOSSE *et al.* 1999). La présence de populations de *Laccaria bicolor* et *L. laccata* composées de petits génets dans les plantations adjacentes aux parcelles inoculées expérimentalement (SELOSSE *et al.* 1999) nous permet de supposer que les génets inoculés précocement pourraient bénéficier d'un avantage compétitif par rapport à ceux surgissant spontanément.

NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

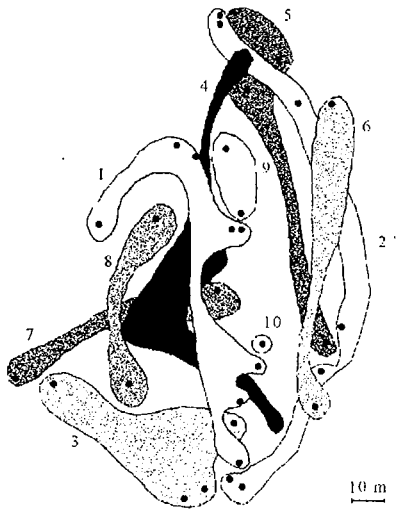


Figure 13 : Structuration spatiale des populations d'*Amanita muscaria* dans la plantation de *Pinus radiata* de *Jenolan Caves* dans le New South Wales, Australie. Les points représentent les sporophores, qui sont regroupés en dix génets différents, très entremêlés (aires numérotées) ; la continuité des ces génets de forme insolite n'est pas certaine, des origines multiples sont stipulées (SAWYER *et al.* 2001).

Dans une forêt naturelle de *Pinus muricata* sur la côte de Californie du Nord (*Point Reyes National Seashore*), âgée d'environ 40 ans, une espèce du genre *Suillus*, *Suillus pungens*, a été étudiée par RAPD et SSCP (BONELLO *et al.* 1998). La population de *Suillus pungens* est composée de six génotypes sur 1200 m^2, dont un seul comprend plus d'un sporophore. 21 sporophores ont été récoltés sur 2 ans. Le génet le plus important comprenait 13 sporophores et couvrait une surface d'au moins 300 m^2 (Figure 14).

Ces résultats sont proches de ceux obtenus pour *Suillus variegatus* (DAHLBERG 1997) et *S. bovinus* (DAHLBERG & STENLID 1994) (cf. § 5.3.3), et confirment que ce genre possède des populations structurées essentiellement en génets étendus et durables, ne se chevauchant pas. Ces caractéristiques, associées à une faible diversité génétique, suggèrent une propagation végétative.

Néanmoins, la présence de génets plus petits peut faire penser que l'établissement par les spores est un processus rare, mais pouvant intervenir à n'importe quel moment, indépendamment de l'âge de la forêt. Un autre constat mérite d'être relevé : lors d'une étude précédente dans le même site de Point Reyes, les fructifications de *Suillus pungens* étaient les plus abondantes, alors qu'elle constituait moins de 3% des mycorhizes (GARDES & BRUNS 1996). BONELLO *et al.* (1998) ont avancé l'hypothèse qu'un transport de carbone efficace entre les racines de l'hôte et le mycélium pourrait expliquer cette différence. Ainsi, la capacité à former des grands mycélia serait liée partiellement à la présence de rhizomorphes, moyen de transport efficace des divers nutriments.

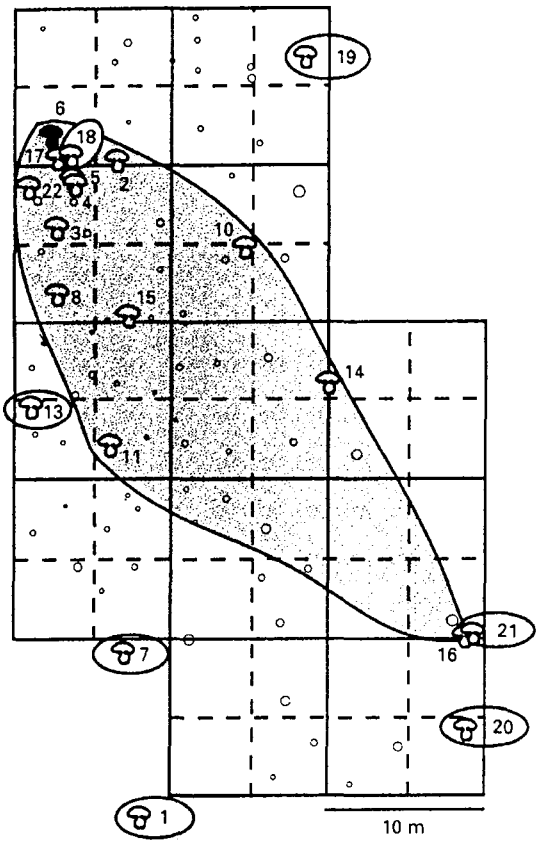


Figure 14 : Structuration spatiale des populations de *Suillus pungens*, dans une pinède de Point Reyes, en Californie. Chaque champignon représente un sporophore. Les ellipses délimitent les génets observés. La surface grisée est de 316 m^2. Les petits cercles représentent les pins, diamètre à l'échelle (BONELLO *et al.* 1998)

Dans le même site de Point Reyes, en Californie du Nord, trois autres espèces considérées comme appartenant au stade tardif ont été étudiées (REDECKER *et al.* 2001). *Amanita francheti*, *Lactarius xanthogalactus* et *Russula cremoricolor* ont formé dans tous les sites étudiés des génets plutôt petits, au maximum de 1,5 m^2, 9,3 m^2 et 1,1 m^2 respectivement. *Amanita francheti* a été récoltée pendant deux ans, et certains génets ont persisté. Par ailleurs, le site où *Amanita francheti* a été récoltée est celui où le grand génet de *Suillus pungens* avait été trouvé par BONELLO *et al.* (1998). Cette forêt avait donc le potentiel de permettre la croissance des mycélia sur une longue durée.

Les auteurs concluent que la propagation par les spores joue un rôle bien plus important dans l'histoire de vie des Russulaceae dans les forêts non dérangées qu'on ne l'avait supposé jusqu'à maintenant. L'appartenance d'un champignon au stade tardif ne permet pas de lui attribuer une stratégie reproductive plutôt qu'une autre. De même, les forêts indemnes de perturbations et présentant une continuité écologique n'hébergent pas uniquement des populations ectomycorhiziennes structurées en grand génets, mais une variété de structures de population en fonction de l'espèce considérée. REDECKER *et al.* (2001) invoquent d'autres facteurs, comme la capacité de former des rhizomorphes, pour expliquer la formation de grands génets.

Une autre espèce du genre *Suillus*, *Suillus grevillei*, inféodée au mélèze, a été étudiée dans une forêt de *Larix kaempferi* de plus de 85 ans au pied du Mont Fuji, au Japon, dans un site soumis à un piétinement fréquent (ZHOU *et al.* 1999). *Suillus grevillei* est structuré en nombreux petits génets (34 pour 47 sporophores analysés), fortement apparentés entre eux. Pour interpréter l'absence apparente d'extension clonale, observée chez les autres espèces de *Suillus* étudiées en forêts matures, les auteurs évoquent la perturbation du site par des facteurs anthropiques, ou une caractéristique intrinsèque de l'espèce, sans pouvoir trancher entre les deux hypothèses.

Dans une forêt de *Fagus sylvatica* âgée de 150 ans, à Aubure dans les Vosges, l'étude de *Laccaria amethystina* a montré que la population de cette espèce était constituée de nombreux petits génets, entremêlés, éphémères et présentant une forte variabilité génétique. Toutefois, de rares génets avaient persisté pendant trois ans (GHERBI *et al.* 1999) (Figure 15). Les auteurs concluent à la prépondérance de la reproduction sexuée, via les spores, dans la dissémination.

Des assertions similaires sont avancées pour *Tomentella sublilacina*. Cette espèce ectomycorhizienne fructifie sous forme résupinée sur le bois mort qui jonche le sol. Elle est très fréquente dans les forêts d'Amérique du Nord associée aux arbres âgés ou aux jeunes plants, dominant souvent, tant en biomasse qu'en abondance au niveau des ectomycorhizes (TAYLOR & BRUNS 1999). Son mycélium se concentre dans la couche organique du sol, et certaines espèces peuvent produire des rhizomorphes, apparemment de type non différencié (BREITENBACH & KRÄNZLIN 1984-2000). D'après (TAYLOR & BRUNS 1999), elle se reproduirait essentiellement par les spores, ne formerait que des petits mycélia éphémères, ce qui constituerait une adaptation aux perturbations de la strate du sol où elle vit.

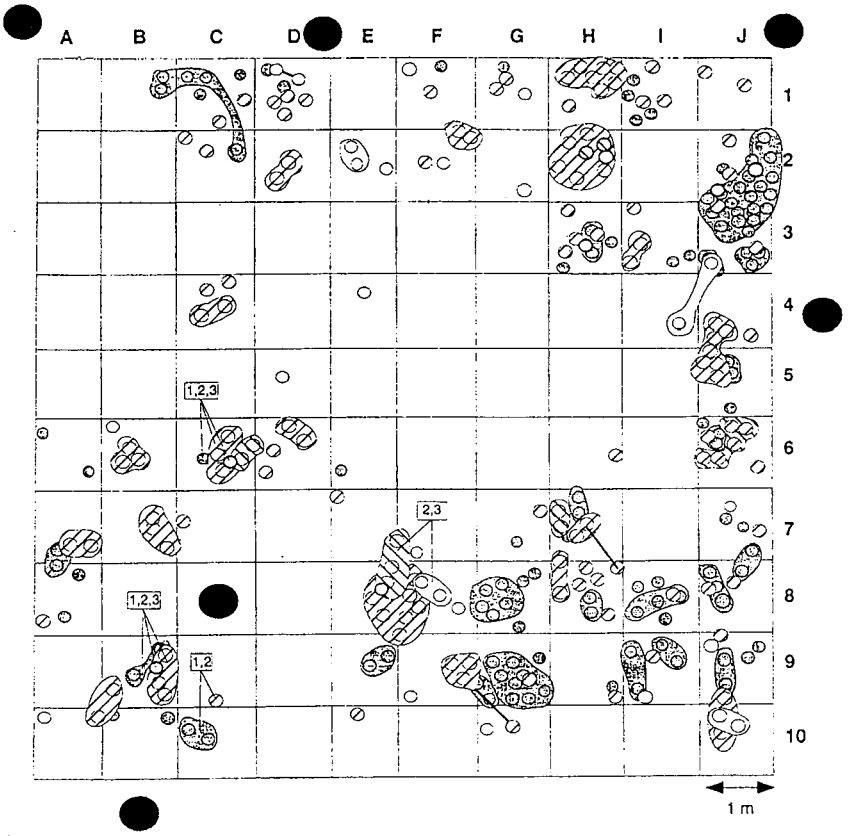


Figure 15 : Structuration spatiale des populations de *Laccaria amethystina* dans la hêtraie d'Aubure, dans les Vosges. Les sporophores appartenant au même génet sont entourés par une ellipse, grisée s'ils ont été récoltés au début de septembre 1994 (récolte 1), hachurée pour ceux de la fin septembre 1994 (récolte 2) et blanche pour ceux de la fin octobre 1997 (récolte 3). Les sporophores sont représentés par des cercles vides, alors que les hêtres le sont par des disques noirs. Les rectangles numérotés indiquent les rares génets persistants retrouvés lors des récoltes 1, 2 ou 3. Les lignes réunissent des génets dont la similarité dépasse 95% (GHERBI *et al.* 1999).

Dans une forêt sclérophylle native dans le New South Wales au Sud de l'Australie, dont l'âge n'est pas précisé, la répartition spatiale des génets de diverses espèces de *Pisolithus* ont été étudiées (ANDERSON *et al.* 2001). Des récoltes sur trois ans ont montré la persistance d'un grand génet de 120 m^2, parallèlement à d'autres génets presque aussi grands, et des génets plus petits. Les auteurs mettent en doute l'attribution à ces espèces d'une stratégie rudérale, associée à une faible compétitivité. La capacité constatée de développer des rhizomorphes serait plutôt caractéristique d'une stratégie de tolérance au stress (COOKE & RAYNER 1984).

Les auteurs concluent que ces espèces peuvent former des grands génets sous certaines conditions. Le rôle des fourmis, provoquant des perturbations dans le sol, est invoqué pour justifier le renouvellement génétique observé. Les espaces libérés de mycélia créeraient des opportunités pour l'établissement de nouveaux génets, via les spores méiotiques (ANDERSON *et al.* 2001).

Une étude portant sur une espèce considérée comme appartenant au stade tardif vient compléter ce panorama : la distribution des génets de *Cortinarius rotundisporus* a été élucidée dans des forêts sclérophylles natives dans le New South Wales, au Sud de l'Australie (SAWYER *et al.* 1999). Dans les trois sites étudiés, il n'a formé que deux à cinq génets par site, chaque site étant dominé par un génet comprenant la plupart des sporophores, d'un diamètre de 9 à 30 m, avec des génets plus petits le côtoyant.

SAWYER *et al.* (1999) concluent que *C. rotundisporus* semble adopter une stratégie compétitive ou résistante au stress, du type attendu dans les forêt matures. Ils remarquent que *C. rotundisporus* forme des rhizomorphes supposés faciliter le transport à longue distance et maintenir durablement un mycélium étendu dans le sol (Figure 16).

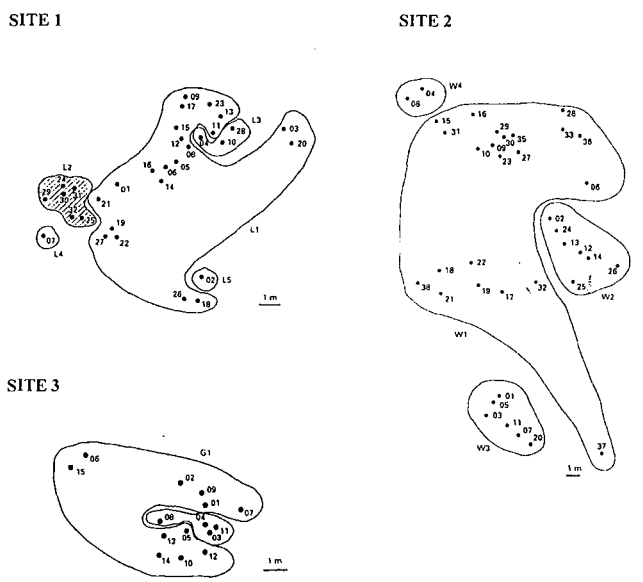


Figure 16 : Structuration spatiale des populations de *Cortinarius rotundisporus* dans trois sites d'une forêt sclérophylle dans le New South Wales, en Australie. Les sporophores (points noirs numérotés) de même génotype sont réunis par des lignes ou des surfaces grisées (SAWYER *et al.* 1999).

Hebeloma cylindrosporum, a été intensivement étudié dans deux habitats différents, soit les dunes côtières et une pinède (GRYTA *et al.* 1997, 2000, GUIDOT *et al.* 1999). GRYTA *et al.* (2000) peuvent faire état d'un suivi de 5 ans d'une population établie à proximité de deux *Pinus pinaster* sur sol sableux, dans les dunes côtières de la côte Atlantique des Landes. Par la suite, d'autres pins ont été plantés sur cette parcelle d'étude de 90 m^2, entraînant une diminution de la fructification (213 sporophores en 1993 contre 60 en 1997). Les méthodes variées qui ont été utilisées (incompatibilité somatique, IGS 1, RFLP et RAPD) permettent d'affirmer que cette

population est structurée en deux génets, qui se sont maintenus pendant 5 ans au même endroit, sans se superposer. L'espace occupé par ces génets s'est modifié: la surface occupée par les fructifications était circulaire au départ, puis les fructifications ne se trouvaient plus que le long d'arcs de cercle à l'extérieur - 2 m au maximum - du disque initial. La taille des génets peut être considérée comme moyenne, et la croissance est somme toute très limitée (Figure 17).

Les derniers résultats (GUIDOT 2000) font état de deux structures différentes selon l'habitat considéré. En dehors de l'habitat dunaire colonisé préférentiellement par l'hébélome, ses fructifications ne sont trouvées que dans des sites forestiers soumis à perturbations, c'est-à-dire les campings installés dans la forêt de pins jouxtant les dunes. Dans ces pinèdes, la population de l'hébélome est structurée en petits génets éphémères (Figure 17).

L'auteur conclut que *Hebeloma cylindrosporum* semble se comporter comme une espèce fugitive. Elle serait capable de coloniser rapidement des microsites perturbés ou à faible compétition interspécifique grâce à une forte production sporale. Son maintien en forêt âgée semble dépendre de la fréquence et de l'intensité des perturbations, alors que l'habitat des dunes lui serait plus favorable, et permettrait la croissance végétative des génets. Ces propositions peuvent être rapprochées de celles de ZHOU *et al.* (1999) sur la structuration de *Suillus grevillei* dans une forêt soumise à un fort piétinement, ou à celles de ANDERSON *et al.* (2001) qui attribuent à la fouille des fourmis l'opportunité pour l'apparition de nouveaux génets de *Pisolithus* spp.

BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

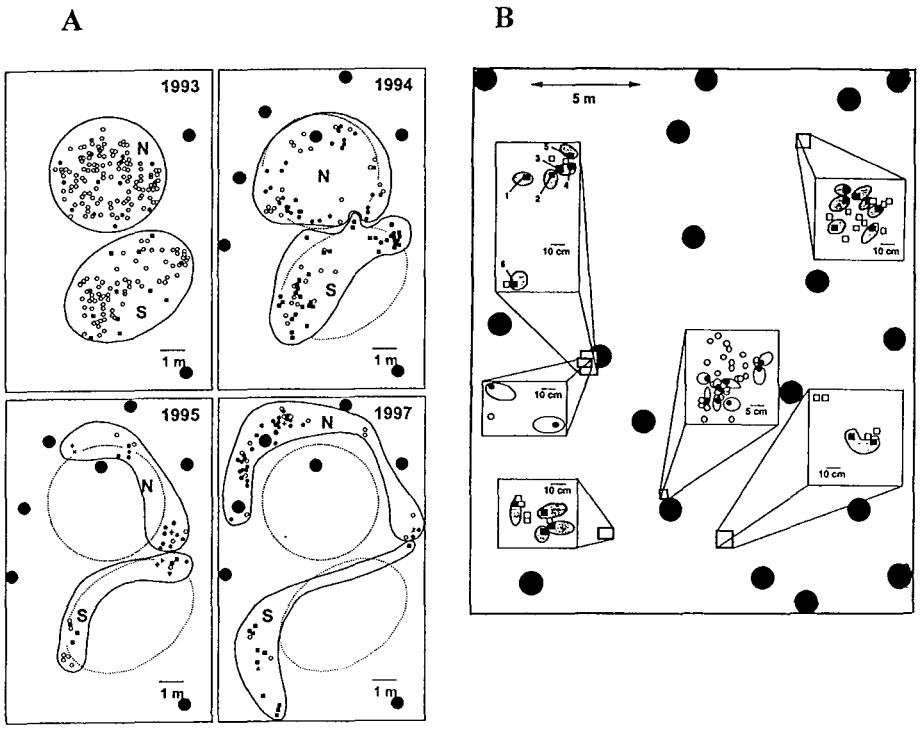


Figure 17 : Structuration spatiale des populations de *Hebeloma cylindrosporum* dans les Landes, en milieu dunaire et dans une pinède. Milieu dunaire (A) : les zone N et S entourent les sporophores de même génotype (même symbole) ou de génotype très proche (symbole différent). On peut voir la progression spatiale de 1993 à 1997 (GRYTA *et al.* 2000). Pinède (B) : les sporophores ont été récoltés en 1990 (petits carrés) et en 1993 (petits cercles) (GUIDOT 2000).

Dans les **forêts matures**, la diversité des structuration des populations est grande.

Des espèces considérées comme appartenant au stade précoce (cf. § 5.3.1) forment soit des petits génets (*Laccaria amethystina,* GHERBI *et al.* 1999), soit des grands (*Suillus bovinus,* DAHLBERG & STENLID 1994 ; *Pisolithus* spp., ANDERSON *et al.* 2001). Des espèces considérées comme appartenant au stade tardif forment soit des grands génets (*Suillus variegatus,* DAHLBERG 1997 ; *Cortinarius rotundisporus,* SAWYER *et al.* 1999) soit des petits (*Amanita francheti, Lactarius xanthogalactus et Russula cremoricolor,* REDECKER *et al.* 2001).

Par conséquent, l'appartenance au stade précoce ou tardif, par ailleurs parfois incertaine, ne permet pas de prédire la taille des génets de la population, ni de lui attribuer une stratégie reproductive. Il en va de même pour l'âge de la forêt, des forêts âgées pouvant héberger des populations structurées en petits génets éphémères (*Laccaria amethystina,* GHERBI *et al.* 1999 ; *Amanita francheti, Lactarius*

xanthogalactus et Russula cremoricolor, REDECKER *et al.* 2001), en opposition avec le modèle proposé par DAHLBERG & STENLID (1995).

Des espèces ectomycorhiziennes privilégient la reproduction sexuée (GHERBI *et al.* 1999, ZHOU *et al.* 1999, REDECKER *et al.* 2001), d'autres la reproduction clonale par croissance végétative (DAHLBERG & STENLID 1994, DAHLBERG 1997, BONELLO *et al.* 1998, SAWYER *et al.* 1999, ANDERSON *et al.* 2001).

Des hypothèses complémentaires sont avancées pour expliquer cette diversité, invoquant soit des caractéristiques spécifiques morphologiques (présence de rhizomorphes, BONELLO *et al.* 1998, SAWYER *et al.* 1999, ANDERSON *et al.* 2001, REDECKER *et al.* 2001) ou physiologiques (capacité accrue de mobilisation du carbone, BONELLO *et al.* 1998, SAWYER *et al.* 1999), soit des facteurs environnementaux (perturbations du site étudié, ZHOU *et al.* 1999, GUIDOT 2000, ANDERSON *et al.* 2001).

Tableau 3 : Synopsis des structures de populations ectomycorhiziennes connues.

ESPECE	TAILLE DES GENETS		FORETS		METHODE d'identification employée	durée l'étude (ans)	REFERENCE
	Surface minimale et (en m^2)	Comentaires sur les génets	arbres dominants	âge			
Suillus bovinus	0,5 à 12	accroissement de la taille des	*Pinus sylvestris, Betula alba*	12-20	Incompatibilité		Dahlberg & Stenlid,
Suillus bovinus	2 à 200	génets selon l'âge de la forêt	*Pinus sylvestris, Picea abies*	70-160	somatique (IS)		1990 et 1994
Suillus variegatus	quelques cm à 180	petits (47 %) et grands	*Pinus sylvestris, Picea abies*	120-130	IS	1	Dahlberg, 1997
Suillus pungens	quelques cm et 300	20 petits et un grand	*Pinus muricata*	variable	RAPD, SSCP	2	Bonello *et al.*, 1998
Suillus grevillei	quelques cm	petits, proches génétiquement	*Larix kaempferi*	85	IGS, MPP	1	Zhou *et al.*, 1999
Laccaria bicolor *	quelques cm à 8	petits génets diversifiés,	*Pseudotsuga menziesii*	12	RAPD	4	Selosse *et al.*,
Laccaria laccata *	quelques cm à 3	certains persistent 4 ans					1998 et 1999
Laccaria amethystina	quelques cm	entremêlés	*Fagus sylvatica*	150	IGS, MPP	3	Gherbi *et al.*, 1997
Hebeloma cylindrosporum	~ 20	2 génets persistant 10 ans	*Pinus pinaster* (dune)	10-20	IGS, RAPD	5	Gryta *et al.* 2000
Hebeloma cylindrosporum	quelques cm	éphémères	*Pinus pinaster* (forêt)	20-25	IGS, RFLP	3	Guidot, 2000
Cortinarius rotundisporus	quelques cm à 300 m2	la plupart sont grands	*Forêt sclérophylle* (3 sites)	?	IGS, MPP	1	Sawyer *et al.*, 1999
Amanita francheti	quelques cm à 1,5	petits, pouvant persister 2 ans	*Pinus muricata,*	40	AFLP	2	Redecker *et al.* 2000
Lactarius xanthogalactus	quelques cm à 9,3	petits	*Pseudotsuga menziesii,*	50	AFLP	1	Redecker et al., 2000
Russula cremoricolor	quelques cm à 1,1		*Lithocarpus densifolia*				

* *taille des génets spontanés et non de ceux des souches inoculées en pépinière, qui ne peut être estimée en raison de la proximité des arbres plantés.*

6 MATERIEL ET METHODES

6.1 Identification et écologie des espèces fongiques étudiées

6.1.1 Xerocomus chrysenteron et X. pruinatus

Les bolets au sens large *Xerocomus chrysenteron* (Bull.) Quél. et *X. pruinatus* (Fr.) Quél. sont deux espèces très similaires, difficiles à reconnaître sur le terrain (Figure 18). *Xerocomus chrysenteron* est considérée comme une espèce polymorphe, dont maintes variétés et formes furent décrites. *Xerocomus pruinatus* est une espèce qui n'a pas été décrite de manière à éliminer toute ambiguïté, notamment en ce qui concerne la couleur de la chair et son bleuissement. En raison de la légère striation de ses spores, elle a été placée dans le genre *Boletellus* (POUZAR 1981, in BINDER & FISCHER 1997).

BINDER & FISCHER (1997) ont pu démontrer, par l'analyse d'une séquence partielle de l'ADNr 28S, que *X. pruinatus* est proche de *X. chrysenteron*, et que par conséquent son placement dans un autre genre n'est pas justifié. De plus, ils ont pu affirmer que la striation des spores est un caractère fiable, permettant de différencier ces deux espèces de manière sûre, les spores de *X. chrysenteron* étant parfaitement lisses.

La striation des spores est visible au microscope optique (agrandissement 1000 x, immersion à huile) à condition de chauffer la préparation environ 1 minute dans le bleu coton concentré. La Figure 19 montre des photos de spores au microscope électronique à balayage, montrant la nette différence entre ces deux espèces.

X. chrysenteron est une espèce aussi fréquente que largement répandue dans les forêts mêlées. La distribution de *X. pruinatus* n'est pas suffisamment connue, mais on trouve cette espèce aussi dans les forêts mêlées. Sa période de fructification serait un peu plus tardive que celle de *X. chrysenteron*.

X. chrysenteron forme des rhizomorphes du type le plus complexe (F - cf. Figure 5). Ils sont formés d'hyphes densément connectées et agglutinées, différenciées entre hyphes conductrices et hyphes corticales, les dernières entourant les premières. Les hyphes conductrices, d'un diamètre plus large, perdent leur cytoplasme et les septa transversaux (BRAND 1989). Ces rhizomorphes sont nombreux et facilement observables (Figure 20). Il n'existe pas de données sur les rhizomorphes de *X. pruinatus*.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Figure 18 : Photographies de *Xerocomus chrysenteron* (à gauche) et *X. pruinatus* (à droite), prises à la réserve mycologique de La Chanéaz. *Xerocomus chrysenteron* se reconnaît à son chapeau craquelé, alors que *X. pruinatus* ne l'est qu'exceptionnellement. Il existe aussi des différences de couleur. Photos aimablement fournies par F. AYER (WSL, Birmensdorf).

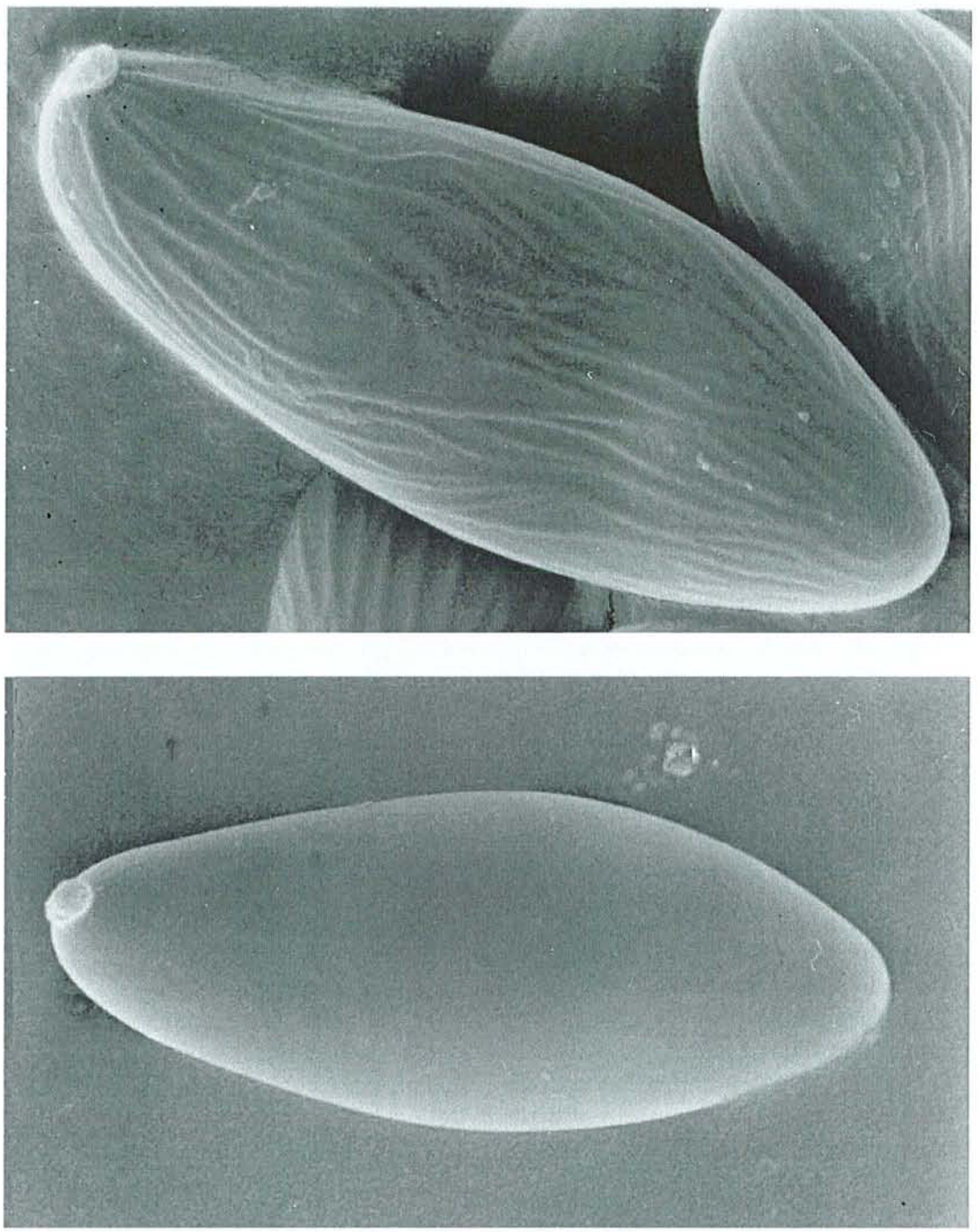


Figure 19 : Spores de *Xerocomus pruinatus* (en haut) et *X. chrysenteron* (en bas), agrandies (8500 x) au microscope électronique à balayage. Les striations propres à *X. pruinatus* sont bien visibles. Les spores proviennent de champignons récoltés à la réserve mycologique de La Chanéaz.

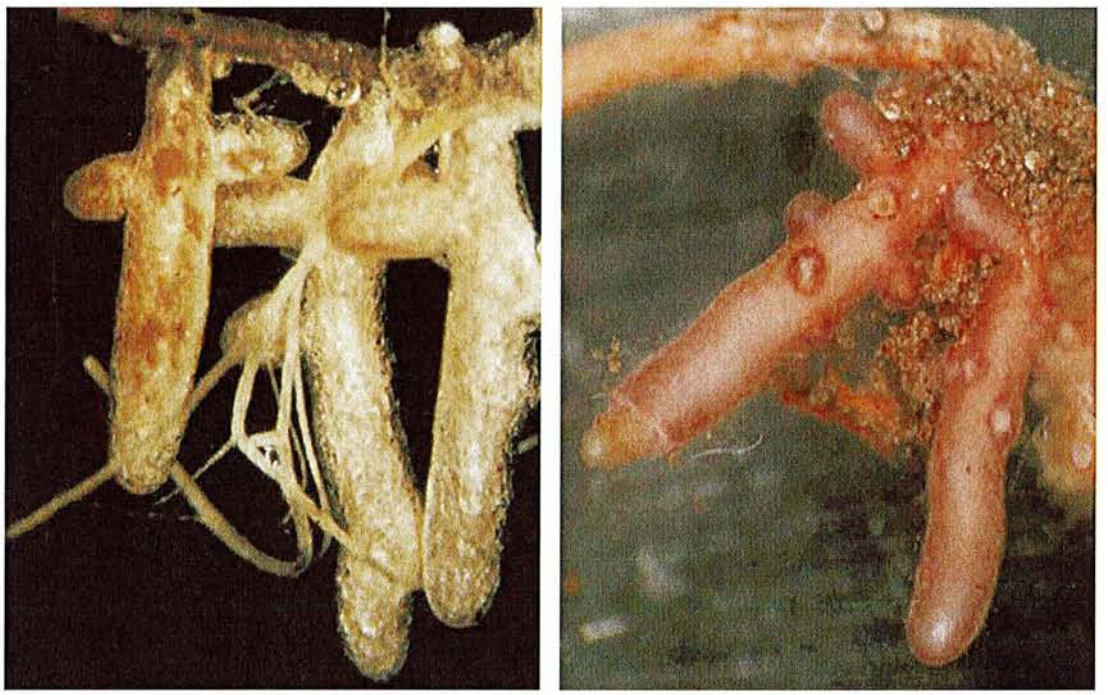


Figure 20 : Racines de *Fagus sylvatica* mycorhizées par *Xerocomus chrysenteron* (à gauche) et *Laccaria amethystina* (à droite). Les rhizomorphes sont bien visibles, partant des ectomycorhizes de *X. chrysenteron*, alors qu'on ne distingue que des fines hyphes chez *L. amethystina*. Photos : à gauche reproduite de AGERER (1987-1998), à droite aimablement fournie par C. DELARUELLE (INRA, Nancy).

6.1.2 Laccaria amethystina

Le genre *Laccaria*, de la famille des Tricholomataceae sensu SINGER (1975), forme des ectomycorhizes avec de nombreuses essences d'arbres (Pinaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Salicaceae), dans tous les continents sauf l'Antarctique (KROPP & MUELLER 1999). Il se distingue, à l'intérieur de la famille, par ses spores présentant une structure particulière des excroissances de la paroi (microfibrilles), unique à ce genre et à deux genres apparentés (MUELLER *et al.* 1993).

Laccaria amethystina Cooke est une espèce immédiatement reconnaissable à sa couleur violette et ses lamelles espacées (Figure 21). A l'intérieur du genre *Laccaria*, elle apparaît isolée (SINGER 1975, CLÉMENÇON 1984, PAZMANY 1993) par la présence de pigments dans tout le basidiome et le mycélium basal. Au microscope optique des caractères discriminants ressortent, comme des grandes cheilocystides, des basides tétrasporiques, des spores ornementées par d'importantes spinules. Les spores sont binucléées, les deux noyaux étant génétiquement identiques, puisqu'ils sont issus d'une division mitotique dans la spore naissante.

Des espèces ressemblantes n'ont été décrites et observées que dans le nord-ouest des Etats-Unis et au Canada. La distribution de *L. amethystina* semble être restreinte à la forêt caducifoliée tempérée du nord-est des Etats-Unis et d'Europe, ainsi qu'aux forêts néotropicales de *Quercus* en Amérique Centrale et en Colombie (MUELLER 1992).

Des rhizomorphes entre les sporophores et les mycorhizes sous-jacentes ont été observées sur *Fagus* (BRAND & AGERER 1986), *Picea* (WEISS 1988) et *Larix* (RAIDL & AGERER 1992). Il s'agit de faisceaux d'hyphes non différenciées et anastomosées, d'un diamètre entre 150 et 250 µm. Le manteau ectomycorhizien est compact et d'une couleur violacée (Figure 20).

Il s'agit d'une espèce multi-stage, qu'on peut observer autour de tous jeunes arbres ou dans des forêts âgées. L'étude de SENN-IRLET & BIERI (1999) constate sa présence aussi bien dans une parcelle d'étude constituée d'arbres de 30 ans que dans une forêt à canopée fermée.

Figure 21 : Sporophores de *Laccaria amethystina*. Photo: G. MUELLER.

6.2 Parcelles d'étude

L'Institut Fédéral de Recherches sur la Forêt, la Neige et le Paysage (WSL, Birmensdorf, canton de Zurich, Suisse) nous a autorisés à effectuer nos recherches dans la réserve mycologique de La Chanéaz. Celle-ci couvre une surface forestière de 75 ha, située à une altitude de 575 m, dans le canton de Fribourg, sur le plateau suisse. La température annuelle moyenne est de 9,4°, et les précipitations atteignent 900-1000 mm par an en moyenne. Le sous-sol est constitué par de la molasse d'eau douce, et l'humus est de type moder. La forêt climacique est la hêtraie, mais l'exploitation a conduit à la plantation de conifères, depuis environ 150 ans. Actuellement, la régénération naturelle par le hêtre est favorisée après les coupes.

La réserve a servi de cadre pour de nombreuses études sur l'écologie et la protection des champignons, par exemple l'influence de la cueillette sur la fructification. L'interdiction de cueillir les champignons dans la réserve est signalée par des panneaux d'information. En plus, 13 parcelles de 300 m^2 ont été clôturées, interdisant l'accès aux personnes non autorisées, ainsi qu'aux grands animaux. Ces parcelles sont quadrillées par des piquets numérotés, plantés tous les mètres, ce qui permet un repérage très précis des champignons récoltés (Figure 24).

Il est avantageux de pouvoir bénéficier d'une telle infrastructure. L'existence de parcelles clôturées nous permet d'exclure, dans l'interprétation des résultats, toute perturbation du type piétinement intensif. De plus, une récolte exhaustive d'espèces comestibles a pu être envisagée.

La végétation de la parcelle 47 est constituée essentiellement d'épicéas, âgés de 135 - 140 ans, ainsi que d'un peuplement de hêtres en sous-étage, plantés vers 1960, afin d'éviter l'acidité excessive. La strate herbacée est faible, il n'y a pas de jeunes arbres. La parcelle adjacente à l'Est, a fait l'objet d'une coupe rase, et la parcelle 47 est par conséquent assez dégagée, lumineuse et s'asséchant assez vite, surtout du côté est.

Dans la parcelle 59, on retrouve des hêtres plantés vers 1960, avec de vieux pins à la place des épicéas. La strate herbacée est plus abondante, accompagnée de jeunes pousses de feuillus variés.

Les deux parcelles d'étude ont été choisies en fonction des données existantes sur la fréquence de l'apparition des champignons ectomycorhiziens. Ces renseignements précieux, issus d'un suivi intensif sur plusieurs années, ont été gracieusement mis à disposition par François AYER.

Ainsi la phénologie et la répartition de *Xerocomus chrysenteron* et de *Laccaria amethystina*, qui ont été répertoriées depuis 1992, indiquaient qu'on pouvait compter sur une fructification abondante et régulière de ces champignons dans les parcelles 47 et 59, sauf sécheresse exceptionnelle. Pour *Xerocomus chrysenteron*, dans la parcelle 47 de 100 m^2, la moyenne annuelle de 1992 à 1996 était de 36 sporophores, avec un minimum en 1992 (17) et un maximum en 1995 (55), le plus fort de la production ayant lieu pendant six semaines, entre la 38ème et la 43ème.

Pour *Laccaria amethystina*, dans la parcelle 58 de 50 m^2, la moyenne annuelle était de 23 sporophores, avec un minimum en 1992 (4) et un maximum en 1996 (37), le plus fort de la production ayant lieu pendant sept semaines, de la 38ème à la 44ème (mi-septembre, début novembre).

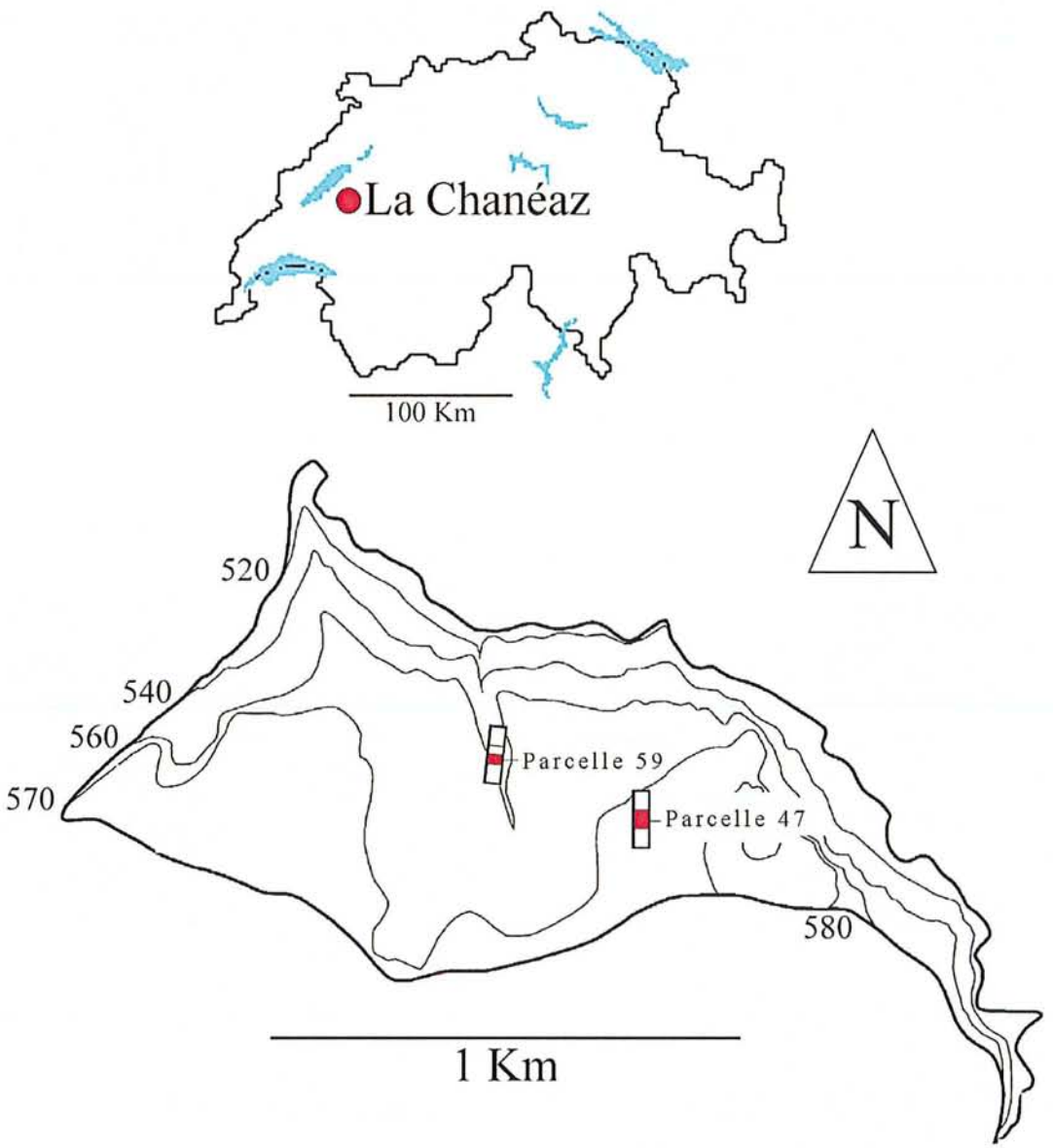


Figure 22 : Situation de la réserve mycologique de La Chanéaz, dans le canton de Fribourg (CH), et carte de la réserve montrant l'emplacement des parcelles d'étude.

Figure 23 : Parcelles 47 (étude de la population de *Xerocomus chrysenteron*) et 59 (étude de la population de *Laccaria amethystina*).

Figure 24 : Récolte de *Xerocomus chrysenteron* dans la parcelle 47 : le piquet et l'écriteau numéroté permettent la pose précise d'un mètre, pour noter les coordonnées du champignon.

6.3 Récoltes

De 1997 à 1999, la période de fructification de *Laccaria amethystina* a duré de début octobre au début novembre, alors que celle de *Xerocomus chrysenteron* and *X. pruinatus* a duré de mi-août à mi-novembre. Les histogrammes des fréquences de récoltes par semaine sont reproduits dans la Figure 25. Les maxima sont très variables d'une année à l'autre, surtout en ce qui concerne *Xerocomus chrysenteron*. En 1999, par exemple, la plus grande poussée a eu lieu en août, bien plus tôt que les années précédentes.

Les deux espèces de *Xerocomus*, difficilement reconnaissables sur le terrain, ont été distinguées par les moyens suivants :

- par l'observation des spores au microscope optique (cf. § 6.1.1),
- par la taille différente des fragments obtenus lors de l'amplification de l'IGS 1 de l'ADN ribosomal (cf. Figure 35),
- par le séquençage de fragments de l'ADN ribosomal (ITS et une partie de la sous-unité 25S, enregistrés dans GenBank sous les numéros AF402139 et AF402140), comparés à ceux disponibles dans GenBank, notamment ceux de BINDER & FISCHER (1997).

Les récoltes ont été intensives, jusqu'à deux fois par semaine pendant la période de fructification, pour assurer une récolte exhaustive. Au total, de 1997 à 1999, 280 sporophores de *Laccaria amethystina* ont été récoltés (Tableau 4). La collecte de *Xerocomus chrysenteron* a totalisé 146 sporophores (Tableau 4).

Les fructifications de *Xerocomus pruinatus* étaient plus rares, et nous n'en avons cueilli que 10 (Tableau 4). Les coordonnées des sporophores ont été notées avec la précision consentie par le marquage au sol (Figure 24) c'est-à-dire moins de 5 cm. Chaque sporophore a été placé dans un sac en plastique individuel, dûment identifié, placé dans une glacière pendant le transport au laboratoire, puis conservé à - 20°.

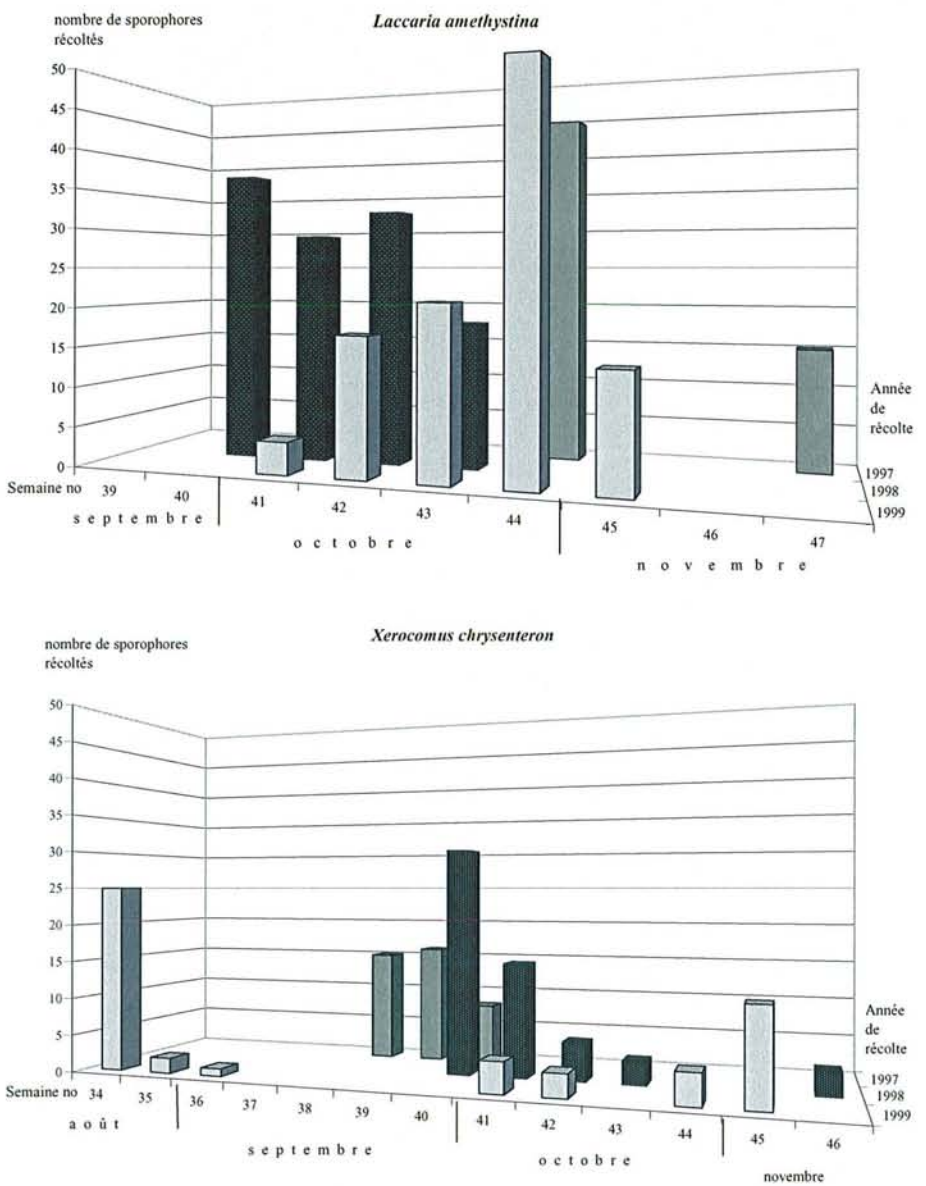


Figure 25 : Phénologie de *Laccaria amethystina* et *Xerocomus chrysenteron* : nombre de sporophores récoltés par semaine à la réserve mycologique de La Chanéaz de 1997 à 1999.

6.4 Méthodes moléculaires

L'ADN total a été extrait directement des sporophores, avec les précautions nécessaires pour éviter toute contamination. Seuls les tissus internes et sains ont été prélevés, en excluant les lamelles ou les pores, où se trouvent les spores méiotiques (génétiquement différentes du reste du champignon) et qui ont de fortes chances d'être contaminés par des organismes extérieurs en raison de la grande surface de tissu exposé. Environ 100 mg de tissu par sporophore ont été broyés au moyen d'un piston, puis l'ADN a été extrait par le protocole CTAB/protéinase K (HENRION *et al.* 1994b).

Les amplifications par PCR des deux fragments de l'ADN ribosomal, IGS 1 et ITS (cf. § 5.4.1) ont été effectuées selon le protocole de HENRION *et al.* (1992, 1994a), sauf qu'un BIOMETRA Uno-thermocycleur a été utilisé (Figure 26).

Pour les amplifications RAPD, les amorces 174 et 157 ont été retenues, car elles généraient des profils suffisamment polymorphes, et le cycle d'amplification prévoyait une haute température d'hybridation (50°C), selon le protocole établi par SELOSSE *et al.* (1998), dans le but d'éviter les résultats aléatoires et non reproductibles (cf. § 8.2.2).

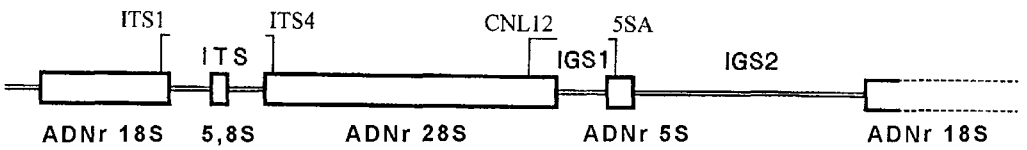
Les amplifiats obtenus ont été séparés par gel d'électrophorèse en utilisant un mélange d'agaroses : 1.4% de *Sigma Wide Range*, et 0.8 % d'agarose banal. Une migration de 5 h (120 V/h) avait lieu en immersion dans du tampon TBE 1x. Les gels étaient ensuite immergés dans une solution de TBE et bromure d'éthidium pendant 20 minutes, rincés à l'eau distillée 15 minutes, puis photographiés par un appareil digital, sous lumière ultraviolette.

Toutes ces procédures ont été strictement standardisées pour permettre la comparaison entre gels effectués successivement. Le standard moléculaire utilisé est l'échelle d'ADN de 100 pb (*Gibco BRL, Life Technologies*). Des gels d'agarose banal 1 à 2 % ont été effectués de manière routinière après chaque étape. Des gels d'acrylamyde *Readygel* 10 % TBE (*Bio-Rad*) ont été utilisés conformément aux instructions du fabricant.

Les fragments de l'ADN ribosomal ITS et IGS 1 ont été amplifiés, puis séquencés en utilisant le kit de séquençage *Big Dye Terminator Cycle* (*Applied Biosystems Inc., Norwalk, USA*), selon les instructions du fabricant. Le séquençage lui-même a été effectué soit sur un *ABI 373XL*, à l'Institut d'Ecologie de l'Université de Lausanne ou sur un séquenceur automatique *ABI Genotyper 310* (*Applied Biosystems Inc., Norwalk, USA*), à l'INRA de Nancy. Les gels étaient lus par le programme *ABI Prism Sequencing* et les séquences éditées par deux programmes, soit *Sequence Analysis* (*Applied Biosystems Inc., Norwalk, USA*) ou *Sequencher* (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI*).

OUTILS MOLECULAIRES UTILISES

a) ITS ET IGS - STRUCTURE DE L'ADN RIBOSOMAL ET POSITION DES AMORCES ITS1 ET ITS4, CNL12 ET 5SA



SEQUENCE DES AMORCES UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION DE L'ADNr (5' à 3') :

ITS1 :	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4 :	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
CNL12 :	CTG AAC GCC TCT AAG TCA G
5SA :	CAG AGT CCT ATG GCC GTG GAT

b) RAPD - SEQUENCE DES AMORCES RAPD UTILISEES POUR L'AMPLIFICATION ALEATOIRE DE NOMBREUX FRAGMENTS

RAPD 174 :	AAC GGG CAG C
RAPD 157 :	CGT GGG CAG G

Figure 26 : Situation des marqueurs de l'ADN ribosomal et séquences des amorces utilisées.

6.5 Traitement des données

La diversité génétique de *Laccaria amethystina* a d'abord été analysée par le polymorphisme génétique de l'ITS et de l'IGS 1, puis les différents génets ont été distingués par la RAPD. Seuls les fragments apparaissant sur les gels de manière prononcée ont été retenus. La RAPD a été répétée, et seules les bandes reproductibles de manière claire ont été retenues pour l'analyse.

Les photos de gels, toutes au même format, ont été placées côte à côte pour détecter les bandes similaires entre gels. Chaque gel comprenait un marqueur positif dans le but d'estimer les variations de migration entre gels. Les sporophores qui avaient des profils identiques pour l'ITS, l'IGS 1 et la RAPD ont été considérés comme appartenant au même génet, et situés d'après leurs coordonnées sur le plan de la parcelle. Nous avons considéré la surface entre les sporophores du même génet

comme représentant la surface du génet, et les sporophores les plus externes comme marquant la limite du génet.

Les bandes générées par la RAPD ont été saisies dans une matrice par leur présence (1) ou absence (0). La matrice rectangulaire contenait, pour *Laccaria amethystina*, le nombre de sporophores analysés (193 lignes) par le nombre de marqueurs retenus pour les deux amorces utilisées (59 colonnes). La fréquence de chaque marqueur et le pourcentage de loci polymorphiques ont été calculés en utilisant le programme POPGENE (YEH *et al.* 1997).

Les distances ou similarités entre les sporophores ont été calculés par quatre méthodes (correspondance simple, coefficients de similarité de Jaccard et Sorensen, et distance euclidienne pour données binaires) qui ont toutes donné des résultats similaires (SIMIL dans le Progiciel R 4.0d3 ; CASGRAIN & LEGENDRE 2001). Le coefficient de Jaccard considère le nombre de marqueurs communs à deux profils (M_{ij}), divisés par le nombre total de marqueurs (M_{tot}), auquel on soustrait le nombre de marqueurs non partagés ($M_i + M_j$).

Un dendrogramme a été construit à partir des matrices de similarité, par la méthode UPGMA (*Unweighted Pairgroup Method with Arithmectic Mean*), en utilisant le Progiciel R (CASGRAIN & LEGENDRE 2001). La matrice binaire a aussi été utilisée pour les analyses UPGMA et NJ (*Neighbour-Joining*) dans PAUP*4.08b (PPC/Altivec) (SWOFFORD 1999).

Un test de Mantel a été effectué pour trouver une éventuelle corrélation entre la distribution spatiale et la distance génétique chez les 193 sporophores de *Laccaria amethystina* (MANTEL & VALAND 1970) en associant la matrice des similarités RAPD avec celle des distances métriques euclidiennes entre sporophores (module MANTEL dans le Progiciel R). La signification statistique de la corrélation a été testée par 999 permutations aléatoires entre les deux matrices. Un résultat significatif est considéré comme atteint si $\geq 95\%$ des valeurs obtenues par permutation étaient supérieures à celle observée. Le test de l'équilibre de Hardy-Weinberg a été effectué en utilisant le programme POPGENE (YEH *et al.* 1997).

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

7 RESULTATS

7.1 Structure génétique et distribution spatiale de *Laccaria amethystina*

Tableau 4 : Caractéristiques des populations de *Laccaria amethystina* dans la réserve mycologique de La Chanéaz.

Laccaria amethystina	Récoltes			
	1997	1998	1999	Total
Sporophores récoltés	59	116	105	280
Analyses IGS 1 et RAPD	44	90	75	209[a]
Génets identifiés	36	69	52	157
Sporophores par génet	1,22	1,30	1,44	1,33
Proportion de génets	0,82	0,77	0,69	0,75
Génets par ha et par an	7 200	13 800	10 400	10 467

[a] *Certaines PCR ont échoué.*

La plupart des 280 sporophores récoltés étaient situés dans la partie Est de la parcelle 59 (Figure 27), celle où le couvert végétal est le plus touffu. Pendant les trois années de récolte, on constate un déplacement des zones de fructification, probablement suivant l'allongement des racines. Il existe une compétition interspécifique, puisque les relevés effectués par le WSL ont répertorié 25 autres espèces en 1997 (dont 19 mycorhiziennes), 42 en 1998 et 1999 (dont 33 mycorhiziennes, F. AYER, communication personnelle).

La variabilité génétique de la population de *L. amethystina* a d'abord été évaluée par l'analyse des régions de l'ADN ribosomal ITS et IGS 1, qui montrent un polymorphisme de taille à l'intérieur du genre *Laccaria* (HENRION *et al.* 1992, SELOSSE *et al.* 1996, 1998, GHERBI *et al.* 1999).

Aucun polymorphisme n'a été trouvé pour l'ITS, qui a généré un produit d'environ 700 pb (ces résultats ne sont pas montrés). L'IGS 1, par contre, a révélé trois profils, qui différaient à la fois par le nombre de fragments amplifiés et par leur taille. Sur les 209 sporophores analysés par cette méthode, le type IGS 1 *AA*, identifié par un seul fragment de 700 paires de bases (pb) a été trouvé dans 113 sporophores (54%). Le type *aa*, avec un seul fragment 760 pb, a été trouvé dans 24 sporophores (12%). Les 72 sporophores restants (34%) étaient des hétérozygotes *Aa* avec deux bandes, à 700 et 760 pb (). Il existe bien un polymorphisme dans ce locus, toutefois insignifiant par rapport à celui révélé par la RAPD (voir infra).

Le séquençage des deux types IGS 1 n'a révélé que peu de divergence (0.8%) dans la plus grande partie du fragment, sauf pour une insertion de 47 pb, semblable à celle trouvée chez *L. amethystina* provenant de la forêt d'Aubure (GHERBI *et al.* 1999), confirmant que ce locus est peu polymorphe à l'intérieur de l'espèce. Les séquences alignées et la séquence consensus sont accessibles à l'URL http://mycor.nancy.inra.fr/

Pour établir si la population était en équilibre d'Hardy-Weinberg, on a considéré que les haplotypes IGS 1 révélaient un locus unique à deux allèles codominants, les types *AA* et *aa* étant homozygotes et les *Aa* hétérozygotes. L'analyse des données de 209 sporophores a révélé un léger déficit d'hétérozygotes (hétérozygotes attendus et espérés : 0,41 et 0,35, respectivement ; homozygotes attendus et espérés : 0,58 and 0,64, respectivement). Cette différence s'est avérée significative par le test du Chi-carré (4,4%; $P < 0,05$).

Le déficit d'hétérozygotes au locus IGS 1 suggère des appariements non aléatoires, bien que l'occurrence de ce processus doive être limitée par l'existence d'incompatibilité sexuelle tétrapolaire (cf. § 5.1.1). Par ailleurs, le nombre d'hétérozygotes indique tout de même l'existence d'un mode de reproduction hétérothallique dans cette population, ce qui est confirmé par les résultats de la RAPD, exposés ci-dessous.

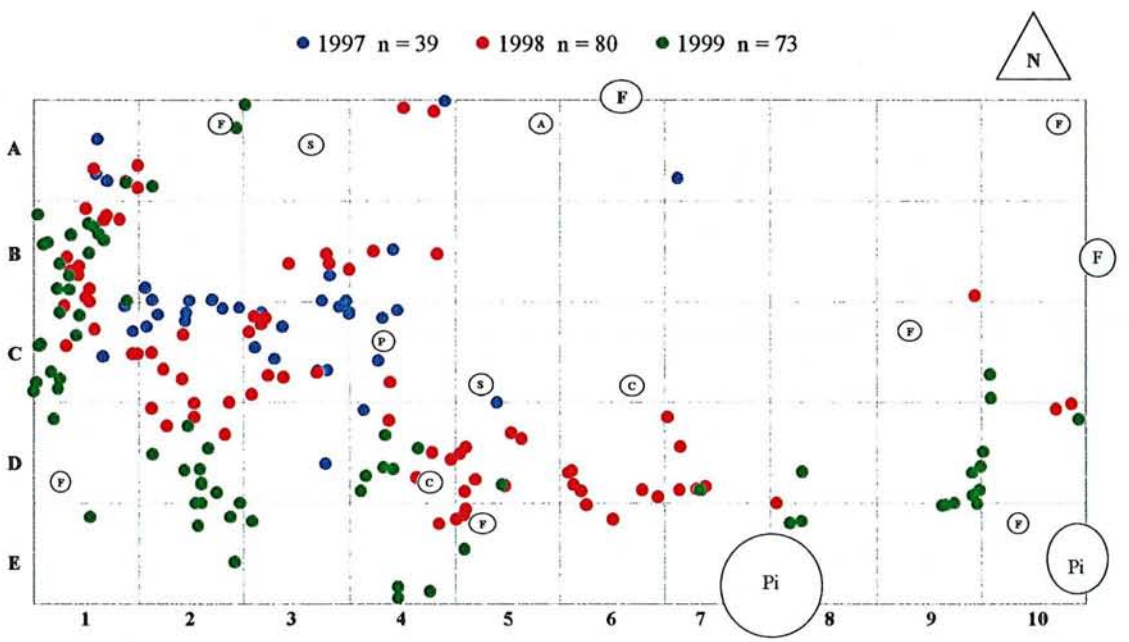


Figure 27 : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Laccaria amethystina* dans la parcelle 59 (5 x 10 m) de la réserve mycologique de La Chanéaz. Seuls les 192 sporophores pour lesquels les deux analyses RAPD ont réussi sont figurés. Les arbres présents sont représentés par des disques jaunes, environ à l'échelle. Pi, *Pinus sylvestris*; F, *Fagus sylvatica*; C, *Corylus avellana*; A, *Acer pseudoplatanus*; S, *Sorbus aucuparia*; P, *Prunus padus*. Les sporophores sont représentes par des disques bleus (1997), rouge (1998) ou vert (1999)

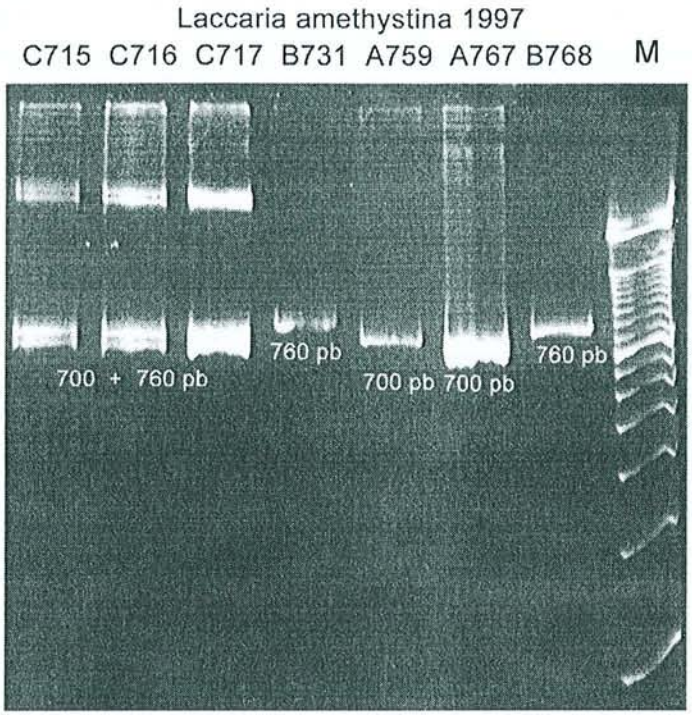


Figure 28 : Gel d'électrophorèse (acrylamide) montrant les trois haplotypes IGS 1 identifiés chez *Laccaria amethystina*. On distingue les homozygotes, B731, A759, A767 et B768, des hétérozygotes, C715, C716, C717. Chez ces derniers, le mélange des deux fragments, qui différent essentiellement par une insertion de 47 pb, donne des hétéroduplexes qui apparaissent comme deux bandes de poids moléculaire très élevé. Le standard moléculaire (M), à droite, ne donne qu'une échelle indicative sur gel d'acrylamide.

La RAPD a permis de mettre en évidence un grand polymorphisme à l'intérieur de la population de *L. amethystina*. Les deux amorces ont généré 59 fragments de taille s'échelonnant entre 180 et 1200 pb. La matrice rectangulaire de présence/absence est accessible à l'URL http://mycor.nancy.inra.fr/Aubure/Aubure.html. La moyenne des fréquences de chaque marqueur est basse, soit de 0,21, et l'écart-type est de 0,31.

Cela reflète le grand polymorphisme des marqueurs, dont la plupart n'ont été trouvés qu'une fois ; de ce fait, l'histogramme de leur distribution ne suit pas une courbe normale (Figure 29). Le pourcentage de loci polymorphiques, très élevé, est de 98 %. Le pourcentage de marqueurs apparaissant uniquement pendant une année est de 25 %, ce qui suggère un renouvellement important d'une saison à l'autre.

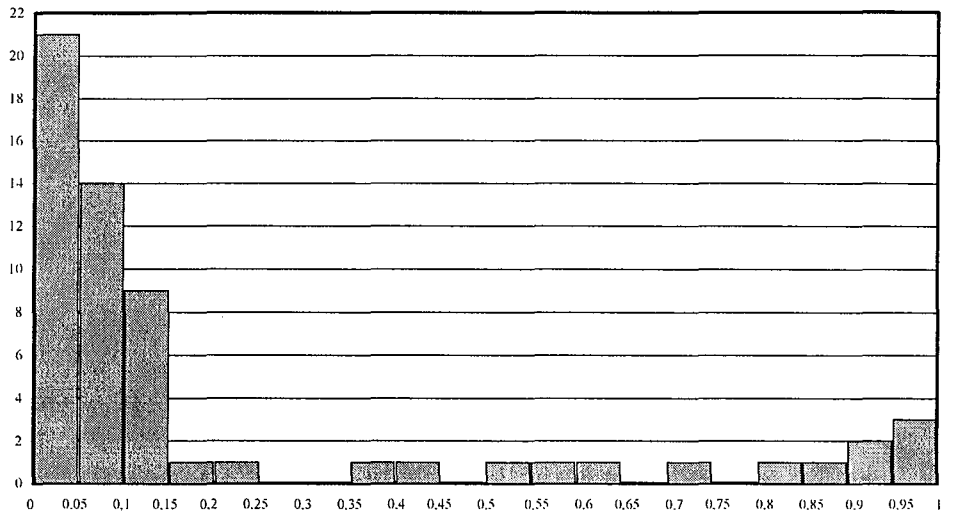
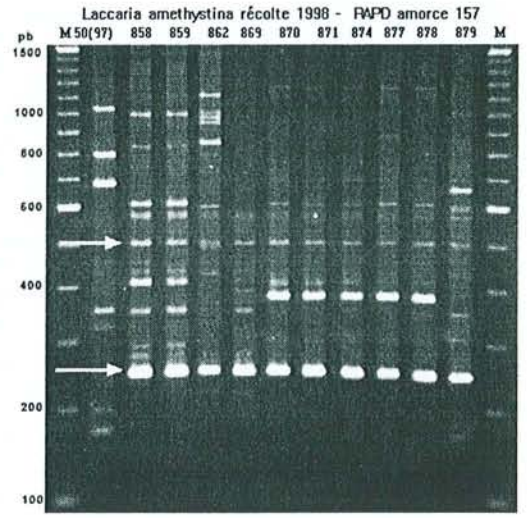


Figure 29 : Histogramme des fréquences des 59 marqueurs RAPD identifiés dans l'analyse de *Laccaria amethystina*. 44 marqueurs ont une fréquence très basse de 0,005 à 0,15. Deux marqueurs ont une fréquence de 1 (toujours présents) et un de 0.99. La distribution n'est pas normale. La moyenne des fréquences est de 0,21 et l'écart-type de 0,31.

Nous avons pu identifier, par la RAPD, 157 profils uniques, pour les 209 sporophores analysés, indiquant une grande variation génétique. La plupart des fragments n'ont été détectés que dans quelques sporophores, et seulement deux fragments, générés par l'amorce 157, étaient présents sur tous les gels (indiqués par des flèches sur la Figure 30). La proportion de génets identifiés, soit le nombre total de profils RAPD divisé par le nombre de sporophores analysés, était de 0.75 (Tableau 4). La plupart des génets ne produisent qu'un seul sporophore. Le nombre moyen de sporophores par génet était 1,33 (Tableau 4).

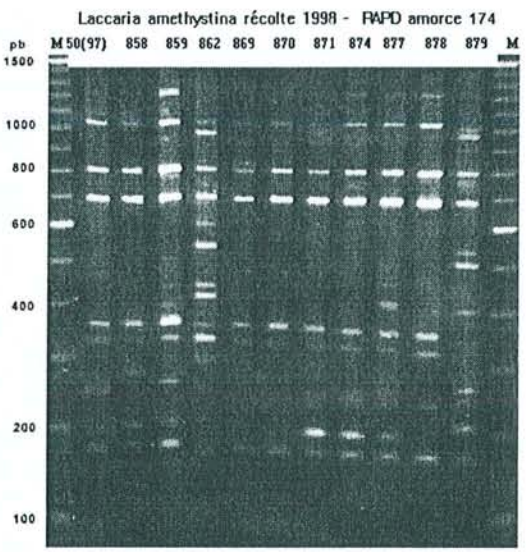
Les sporophores appartement au même génet n'ont pas été nécessairement cueillis le même jour. Des sporophores appartenant au même génet ont pu être cueillis pendant 5 à 22 jours. Seulement six génets (<4%) ont été trouvés pendant plus d'un an (Figure 33). Les génets I, Q, U, et X ont été trouvés en 1997 et 1998, alors qu'un seul génet, le R, a été récolté en 1998 et 1999. La distance maximale qui a été trouvée entre deux sporophores appartenant au même génet et récoltés pendant deux ans consécutifs allait de 0,3 (génet I) à 2,2 m (génets Q & U). Le plus grand génet, le S, comprenait des sporophores récoltés en 1997 et 1999 (Figure 33).

Lorsque plus d'un sporophore appartient à un même génet, nous ne pouvons affirmer qu'il existe une continuité souterraine. Il peut s'agir de ramets, c'est-à-dire de génets qui se sont fragmentés lors de la croissance, ou de clones, issus de la reproduction végétative (déplacement de mycélium par des petits animaux fouisseurs, par exemple).



pb	858	859	862	869	870	871	874	877	878	879
1163	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
1125	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1011	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1001	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
962	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
865	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
845	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
703	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
616	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
578	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
506	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
401	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
385	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
356	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
290	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
251	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
total	8	8	9	5	6	6	5	7	6	10

Figure 30 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant un exemple de profils obtenus chez *Laccaria amethystina* par l'amorce RAPD 157 (sauf le premier échantillon, 50(97), le marqueur positif obtenu par RAPD 174). Les deux bandes présentes sur tous les gels sont indiquées par une flèche blanche. A droite, la matrice de présence/absence des bandes reproductibles, définissant un profil RAPD pour chaque sporophore analysé. La première colonne indique la taille, en paires de base, des bandes retenues.



pb	858	859	862	869	870	871	874	877	878	879
1033	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
950	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
825	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1
752	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0
699	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
580	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
547	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
504	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
414	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
365	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
340	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
331	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
279	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
254	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
178	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
total	4	7	8	6	5	5	5	8	6	9

Figure 31 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant un exemple de profils obtenus chez *Laccaria amethystina* par l'amorce RAPD 174. Le premier échantillon est le marqueur positif, récolté en 1997. A droite, la matrice de présence/absence des bandes reproductibles, définissant un profil RAPD pour chaque sporophore analysé. La première colonne indique la taille, en paires de base, des bandes retenues.

Les génets de *L. amethystina* sont entremêlés (Figure 33). Même dans la zone de plus forte densité (coordonnées B1, C1 et C2), la plupart des génets n'ont été trouvés qu'une fois. Le génet le plus grand (S) comprenait 13 sporophores, tous du type IGS 1 *AA*, et ses deux principales surfaces, prises ensemble, couvraient environ 0,75 m^2 (coordonnées D2/D4). La taille moyenne des 26 génets qui comprenaient plus d'un sporophore était de 1,1 m, allant de quelques cm (génet J, C1) à 5,40 m (génet B, A1 à A7).

Les indices de similarité de Jaccard obtenus pour les échantillons dont le profil RAPD est montré dans la Figure 29 et la Figure 30 figurent dans le Tableau 5 ci-dessous. Neuf sporophores appartiennent à l'haplotype IGS *Aa*, seul le 869 est homozygote pour ce locus (*AA*). Il ressort des Figures 29 et 30 que les sporophores 870, 871, 874, 877 et 878 ont des profils assez similaires. Les 870 et 871 sont d'ailleurs identiques, présentant des similarités supérieures à 0,5.

Tableau 5 : Matrice des indices de similarité de Jaccard calculée à partir des matrices de profils RAPD 157 et 174 des Figures 30 et 31.

	858	**859**	**862**	**863**	**869**	**870**	**871**	**874**	**877**	**878**
859	0,80									
862	0,26	0,33								
863	0,20	0,23	0,38							
869	0,44	0,63	0,40	0,35						
870	0,44	0,53	0,27	0,21	0,47					
871	0,44	0,53	0,27	0,21	0,47	1,00				
874	0,47	0,56	0,29	0,22	0,50	0,91	0,91			
877	0,29	0,43	0,45	0,35	0,53	0,63	0,63	0,56		
878	0,33	0,42	0,38	0,41	0,53	0,64	0,64	0,57	0,80	
879	0,41	0,42	0,38	0,29	0,36	0,15	0,15	0,16	0,21	0,24

La matrice complète de similarité de Jaccard peut être consultée à l'adresse URL http://mycor.nancy.inra.fr/Aubure/Aubure.html. Les fréquences des 18'336 indices de similarité sont montrées dans l'histogramme de la Figure 32. L'histogramme permet une première évaluation des données statistiques, et révèle des tendances qui peuvent être contrôlées ultérieurement. Les indices présentant une valeur moyenne de 0,6 sont les plus nombreux, indiquant une parenté diffuse. Les fréquences de l'histogramme ne dévient pas significativement de la courbe normale, bien que les génets identiques (valeur 1) décalent la courbe vers la gauche (*Skewness* : - 0,554, *Kurtosis* : 0,879).

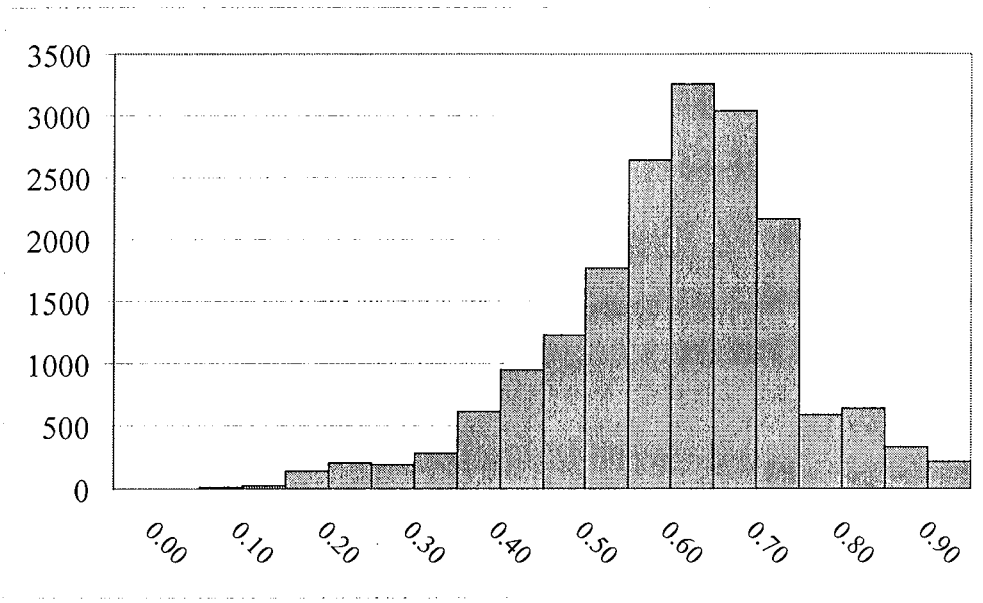


Figure 32 : Histogramme des fréquences des 18'336 indices de similarité de Jaccard, calculés dans l'analyse de *Laccaria amethystina*. La moyenne est de 0,652 et l'écart-type 1,39.

Une analyse statistique de la diversité génétique a été réalisée à l'aide des algorithmes UPGMA et NJ afin de déterminer la similarité entre les génets obtenus par RAPD. Le dendrogramme obtenu par NJ (Figure 34), montre une parenté diffuse entre génets. Les génets comprenant plus d'un sporophore sont indiqués par des rectangles grisés, identifiés par une lettre, qui permet de les situer dans la Figure 33. Le dendrogramme met bien en évidence leur faible occurrence.

Pour illustrer la parenté diffuse et le fait que les génets apparentés ne sont pas forcément proches, nous avons mis en évidence un groupe de sporophores, le regroupement A situé en haut du dendrogramme de la Figure 34.

La similarité des profils RAPD dans ce groupe (sporophores C714, B731, C802, C807,C810, B817, B 818, B 819, B824 et B 825) se situait entre 0.39 and 0.59 (en excluant B 817 et B819 qui sont identiques). Ces sporophores sont indiqués par un astérisque dans la Figure 33.

Cinq d'entre eux sont regroupés spatialement (coordonnées B1), ce sont les B817 et B819 (génet K), B 824, B818 et B825, ils forment un regroupement sur le dendrogramme, et ont été cueillis en 1998 (B817, B818 et B819 le 30.9.1998 et B824, B825 le 8.10.1998). B731, récolté l'année précédente (le 27.10.1997), n'est pas très éloigné de ce groupe, ni spatialement (coordonnées C4) ni génétiquement (proche du regroupement précédent sur le dendrogramme). Ces six sporophores présentent le même haplotype IGS 1, le *aa* (un seul produit de 760 pb).

Les quatre autres sporophores, plus éloignés génétiquement d'après le dendrogramme, et divisés en deux groupes, appartiennent à l'haplotype IGS 1 *Aa* (deux produits de 760 et 700 pb). C714 et C802, éloignés génétiquement dans le

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

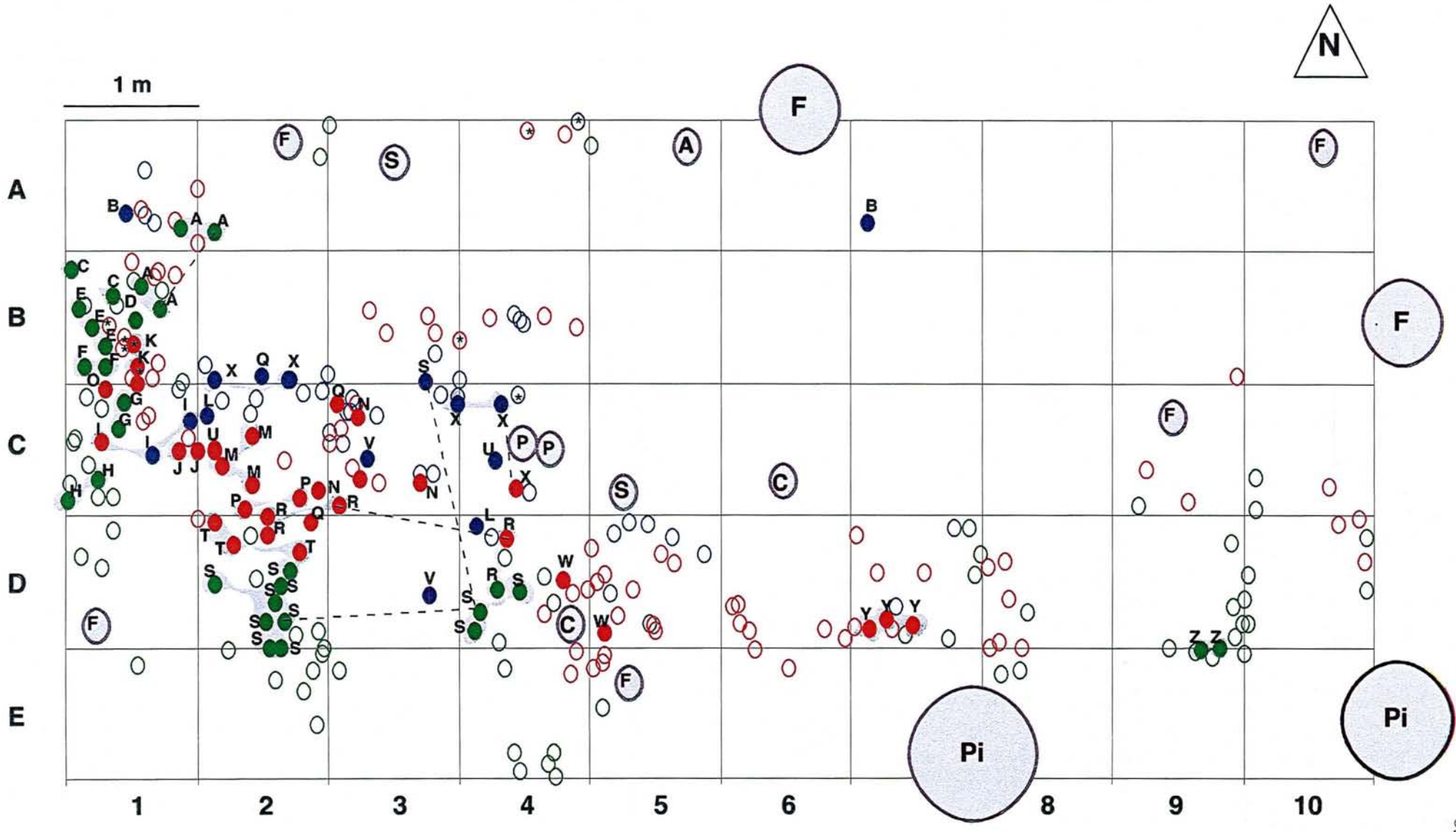
regroupement considéré et dans le temps (ils n'ont pas été cueillis la même année), sont proches géographiquement (coordonnées A4). C807 (coordonnées B9) et C810 (coordonnées B3-B4), cueillis à la même date (le 30.9.1998) sont éloignés spatialement et génétiquement dans le regroupement considéré.

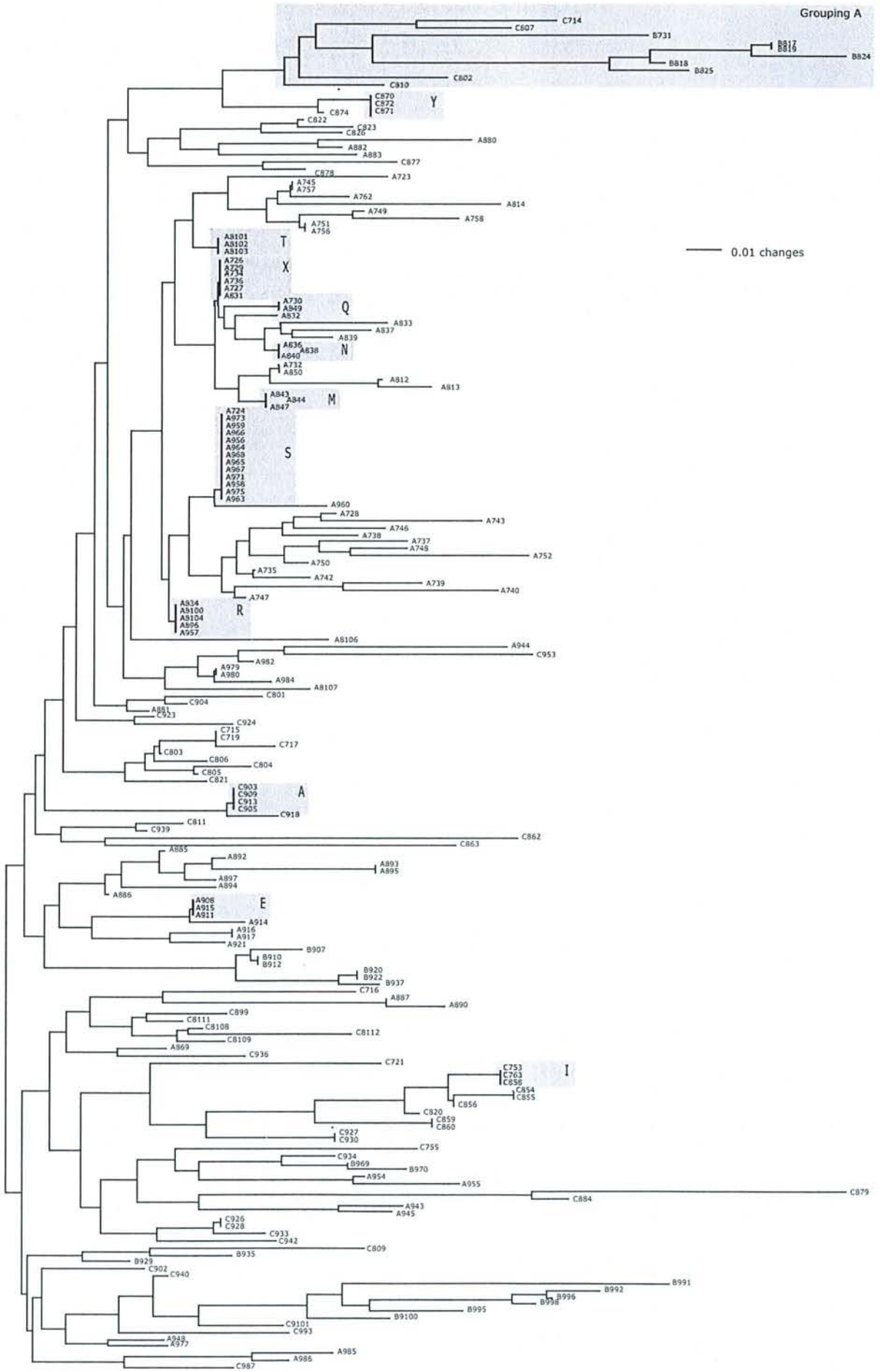
Ce groupe possède 4 allèles polymorphiques communs, dont un, le 752, présente une distribution intéressante. Il est apparu en 1997 et 1998, a disparu en 1999. Il est associé aux haplotypes *Aa* et *aa* uniquement. Sa distribution spatiale, en dehors de celle définie par le groupe A, se résume à deux groupes spatialement cohérents. Un groupe de 6 sporophores est placé en C1, à moins d'un mètre de distance du groupe situé en B1. Le deuxième groupe de quatre sporophores se trouve en D7, à 6 m de distance de C1.

La proximité spatiale des génets apparentés, si est vérifiée dans quelques cas (par exemple, le regroupement comprenant les sporophores B817, B818, B819, B824 et B825), ne peut pas être généralisée. Certains profils RAPD très divergents ont été trouvés sur deux sporophores adjacents (voir coordonnées B1 et C1). Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que le test de Mantel n'ait pas révélé de corrélation significative entre les distances génétiques et les distances spatiales (r = - 0.04, P = 0.13), confirmant que la distance spatiale entre les sporophores, dans cette parcelle de 50 m^2, ne joue qu'un rôle marginal dans la structuration de la population.

Figure 33 (page suivante) : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Laccaria amethystina* et des génets dans la parcelle 59 (5 x 10 m) de la réserve mycologique de La Chanéaz. Les arbres présents sont représentés par des disques grisés, environ à l'échelle. Pi, *Pinus sylvestris*; F, *Fagus sylvatica*; C, *Corylus avellana*; A, *Acer pseudoplatanus*; S, *Sorbus aucuparia*; P, *Prunus padus*. Les sporophores sont représentes par des cercles bleus (1997), rouge (1998) ou vert (1999). Les sporophores qui appartiennent au même génet sont représentés par des cercles pleins et indiqués par des lettres majuscules, qui les identifient également sur le dendrogramme de la Figure 33. Les zones grisées entourent les sporophores du même génet. Les lignes pointillées connectent deux parties d'un génet identique. Les sporophores regroupés dans le regroupement A du dendrogramme NJ (Figure 33) sont marqués par *; leurs profils RAPD montrent une similarité modérée de 39 à 59%.

Figure 34 (page 86) : Dendrogramme obtenu par l'algorithme Neighbor-Joining illustrant les relations entre profils RAPD des *Laccaria amethystina* récoltés dans la parcelle 59 (5 x 10 m) de la réserve mycologique de La Chanéaz. Pour l'analyse, l'algorithme de recherche de distance de PAUP 4.0b8 a été utilisé. L'échelle représente 0.5 changements. Les lettres majuscules indiquent le type IGS 1 (A, *AA*; B, *aa*; C, *Aa*), le numéro qui suit indique l'année de récolte (7, 1997; 8, 1998; 9, 1999) et le numéro suivant indique le sporophore. Les génets comprenant plus de trois sporophores sont indiqués par des rectangles reprenant les lettres attribuées dans la Figure 33. Le rectangle grisé situé en haut du dendrogramme indique le regroupement A de la Figure 33.


N
1 m
A
B
C
D
E
1
2
3
4
5
6
8
9
10
F
S
A
C
P
Pi


Grouping A
C714
C607
B731
B817
B816
B824
B818
B825
C802
C810
C870
C872
C871
Y
C874
C822
C823
C826
A880
A882
A883
C877
C878
A723
A745
A757
A762
A814
A749
A758
A751
A756
A3101
A3102
A3103
T
A726
A729
A734
A736
A727
A631
X
A730
A849
A832
Q
A833
A837
A839
A836
A838
A840
N
A732
A850
A812
A813
A843
A844
A847
M
A724
A973
A959
A966
A956
A964
A968
A965
A967
A971
A958
A975
A963
S
A960
A728
A743
A746
A738
A737
A748
A752
A750
A735
A742
A739
A740
A747
A834
A3100
A3104
A896
A957
R
A3106
A944
C953
A982
A979
A980
A984
A8107
C801
C904
A881
C923
C924
C715
C719
C717
C803
C806
C804
C805
C821
C903
C909
C913
C905
C918
A
C811
C939
C862
C863
A885
A892
A893
A895
A897
A894
A886
A908
A915
A911
E
A914
A916
A917
A921
B907
B910
B912
B920
B922
B937
C716
A887
A890
C899
C8111
C8108
C8112
C8109
A869
C936
C721
C753
C763
C856
I
C854
C855
C856
C820
C859
C860
C927
C930
C755
C934
B969
B970
A954
A955
C884
C879
A943
A945
C926
C928
C933
C942
C809
B935
B928
C902
C940
B991
B992
B996
B998
B995
B9100
C9101
C993
A948
A977
A985
A986
C987
0.01 changes

7.2 Structure génétique et distribution spatiale de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus*

Tableau 6 : Caractéristiques des populations de *Xerocomus chrysenteron* et *Xerocomus pruinatus* dans la réserve mycologique de La Chanéaz.

Xerocomus chrysenteron	Récoltes			
	1997	**1998**	**1999**	**Total**
Sporophores récoltés	39	56	51	146
Analyses IGS 1 et RAPD	39	56	51	146
Génets identifiés	1	1	1	1
Sporophores par génet	39	56	51	146
Xerocomus pruinatus				
Sporophores récoltés	7	2	1	10
Analyses IGS 1 et RAPD	7	2	1	10
Génets identifiés	1	1	1	1
Sporophores par génet	7	2	1	10

Les sporophores de *X. chrysenteron,* collectés entre 1997 et 1999, étaient distribués aléatoirement dans la parcelle 47 (Figure 38), comme cela a été remarqué depuis 1992 (F. AYER, communication personnelle). Les sporophores de *X. pruinatus* étaient quant à eux regroupés sur une surface de 40 m^2, moins de la moitié de la parcelle (coordonnées H7 à A10). Ils sont de plus répartis en deux groupes spatialement distincts, de 5 à 10 m^2.

La communauté d'espèces partageant la parcelle avec *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* est réduite par rapport à la parcelle 59. En effet, seulement 13 espèces ont été répertoriées en 1997 (dont 7 mycorhiziennes), 11 en 1998 (dont 6 mycorhiziennes) et 16 en 1999 (dont 10 mycorhiziennes, F. AYER, WSL Birmensdorf, communication personnelle).

L'amplification de l'ITS de *X. chrysenteron* et *X. pruinatus* n'a donné qu'un seul fragment de 740 pb., confirmant la parenté génétique de ces deux espèces (BINDER & FISCHER 1997). Par contre, la taille des fragments obtenus par amplification de l'IGS 1 a montré une grande différence entre les deux espèces. *Xerocomus chrysenteron* était caractérisé par un seul fragment de 500 pb, alors que *X. pruinatus* avait deux fragments d'environ 800 et 900 pb (Figure 35).

Les 146 sporophores de *Xerocomus chrysenteron* récoltés au cours des trois ans présentaient le même profil RAPD, pour les 13 marqueurs reproductibles retenus pour les amorces RAPD 174 et 157 (Figure 36). Des résultats identiques, non détaillés ici, ont été obtenus en utilisant d'autres amorces RAPD, ainsi qu'avec l'amorce microsatellitaire GTG5. Cette homogénéité génétique suggère que nous nous trouvions en présence d'un seul génet sur une surface d'au moins 100 m^2. La fructification aléatoire sur toute la parcelle n'incite pas à supposer l'existence de ramets. Etant donné que le taux de croissance du mycélium est estimé (avec

beaucoup d'incertitudes) à un demi-mètre par an, ce génet pourrait être âgé de 25 à 50 ans au minimum (certainement plus, puisque l'on ne connaît pas ses limites). Lors d'une récolte supplémentaire réalisée en 2000, 15 sporophores supplémentaires ont été récoltés dans et autour de la parcelle 47. Seulement cinq *Xerocomus chrysenteron* ont été trouvés ce jour-là en dehors de la parcelle 47, dont quatre étaient localisés dans la parcelle adjacente située au nord. Le cinquième était distant d'environ 60 m au sud de la parcelle 47, les deux sporophores les plus éloignés étaient à environ 110 m l'un de l'autre. Nous ne pouvons pas affirmer qu'il existe une continuité entre les deux sporophores les plus éloignés. Par contre, étant donné la répartition des sporophores sur la parcelle adjacente, il semble probable que ce génet recouvre au moins 200 m^2, de façon continue, ce qui doublerait au moins son âge. Son origine pourrait remonter à la plantation des *Picea abies*, soit environ 140 ans.

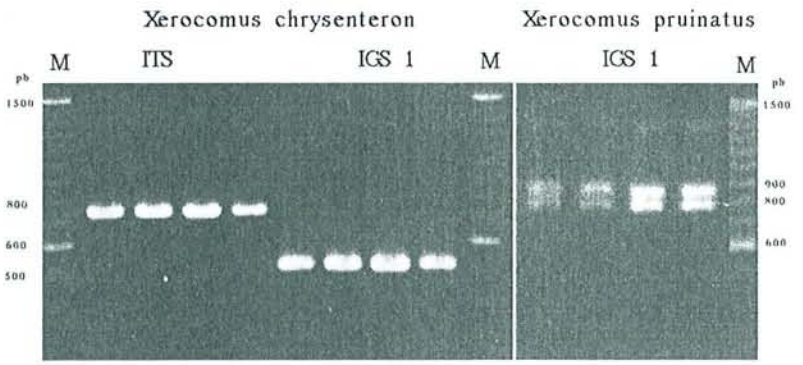


Figure 35 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant des exemples de produits d'amplification de l'ITS et l'IGS 1, pour *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus*. Le produit d'amplification de l'ITS de *X. pruinatus*, de même taille que celui de *X. chrysenteron* n'apparaît pas sur ce gel.

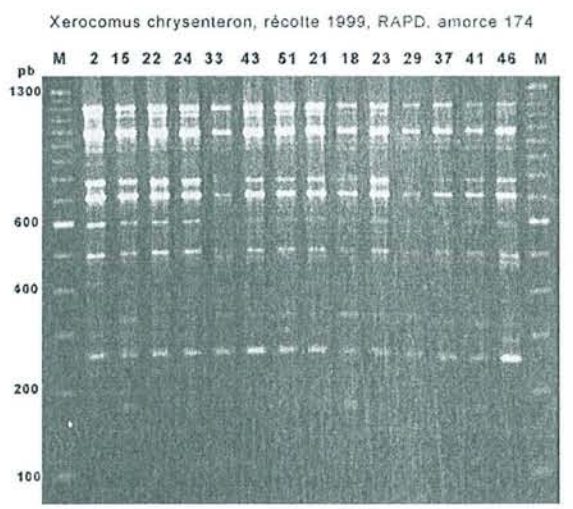


Figure 36 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant l'unique profil obtenu chez les sporophores de *Xerocomus chrysenteron* par l'amorce RAPD 174.

A nouveau, les même profils IGS et RAPD ont été trouvés pour les quinze sporophores récoltés en 2000 (ces résultats ne sont pas montrés). Nous n'avons pas pu délimiter le contour exact de ce génet.

Les 10 sporophores de *X. pruinatus* cueillis dans la parcelle 47 appartenaient à un seul génet, qui couvre au moins 40 m^2. La répartition spatiale suggère que nous soyons en présence de deux ramets. Les cinq sporophores récoltés en 2002 autour de la parcelle appartenaient quant à eux à quatre génets différents, comme révélé par la RAPD (Figure 37), ce qui suggère que le génet de la parcelle ne s'étende que de manière limitée à l'extérieur de celle-ci.

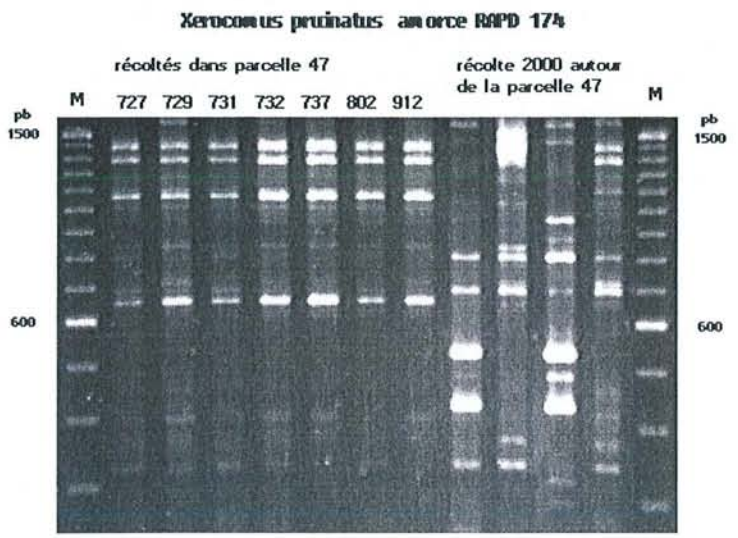
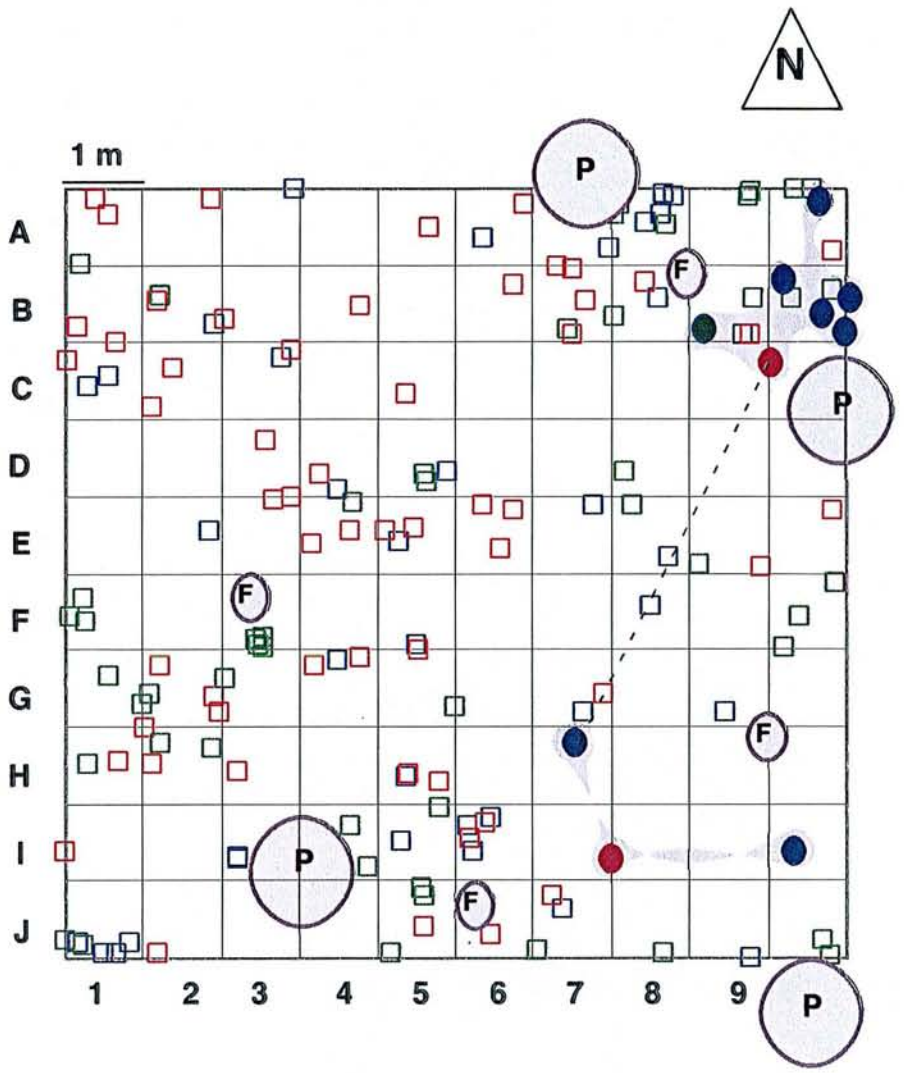


Figure 37 : Gel d'électrophorèse (agarose) montrant l'unique profil obtenu chez les sporophores de *Xerocomus pruinatus* récoltés dans la parcelle 47 par l'amorce RAPD 174 (à gauche). Les profils montrés appartiennent à des sporophores cueillis en 1997, 1998 et 1999. A droite, les profils des *Xerocomus pruinatus* récoltés à l'extérieur de la parcelle en 2000 montrent des profils différents.

Figure 38 (page suivante) : Représentation schématique des positions relatives des sporophores de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* dans la parcelle 47 (10 x 10 m) de la réserve mycologique de La Chanéaz. Les arbres présents (P, *Picea abies*; F, *Fagus sylvatica*) sont représentés par des disques grisés, à peu près à l'échelle. Les sporophores de l'unique génet de *X. chrysenteron* sont représentés par des carrés bleus (1997), rouges (1998) ou verts (1999). Les sporophores de l'unique génet de *X. pruinatus* sont représentés par des cercles (bleu foncé, 1997; bordeaux, 1998; vert foncé, 1999). Les surfaces grisées entourent les sporophores du génet de *X. pruinatus*.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY


N
1 m
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
1
2
3
4
5
6
7
8
9
P
F
P
F
F
P
F
P

8 DISCUSSION

8.1 Interprétations des résultats

Les stratégies de colonisation et de croissance peuvent être inférées par la taille des génets d'une population. Les densités de génets varient entre un ou deux génets par hectare jusqu'à 5200 génets.ha^{-1}, selon l'espèce et l'âge de la forêt (GRYTA *et al.* 1997, GHERBI *et al.* 1999, DAHLBERG 2001, REDECKER *et al.* 2001). Nous avons vu (§ 5.4.2) que la taille des génets des champignons ectomycorhiziens peut varier avec l'âge de la forêt, la présence de petits génets indiquant une colonisation récente par les spores, alors que les génets étendus ne peuvent être obtenus que par la croissance végétative (DAHLBERG & STENLID 1990, 1995, DAHLBERG 2001).

Des études récentes ont pourtant démontré que des forêts matures peuvent héberger des populations constituées de nombreux petits génets plus ou moins éphémères, privilégiant la reproduction par les spores (GHERBI *et al.* 1999, GUIDOT 2000, REDECKER *et al.* 2001). De ce fait, l'établissement initial par les spores, suivi de croissance des mycélia, et la colonisation continue par les spores devaient être considérés comme deux extrêmes d'un continuum plutôt que comme un schéma défini séparant les Basidiomycètes ectomycorhiziens en deux catégories.

Comme la structuration spatiale des populations ectomycorhiziennes diffère selon les taxa (DAHLBERG 2001), nous avons choisi d'analyser trois espèces, *Laccaria amethystina, Xerocomus chrysenteron*, et *X. pruinatus* dans un même site, la forêt mixte de La Chanéaz, dans des parcelles protégées. Dans la forêt de La Chanéaz, l'analyse moléculaire de la variation génétique a révélé deux stratégies distinctes de colonisation et de maintien des populations de champignons ectomycorhiziens, à une faible distance l'une de l'autre, dans un habitat similaire.

Tous les sporophores de *Xerocomus chrysenteron* sont génétiquement identiques pour tous les loci testés, pendant trois ans, sur une surface de 100 m^2, indiquant la présence d'un mycélium de grande taille génétiquement homogène. De la même manière, *Xerocomus pruinatus* forme un génet (éventuellement séparé en deux ramets) recouvrant au moins 40 m^2 dans la parcelle 47, stable pendant trois ans, entremêlé avec celui de *X. chrysenteron*, mais pas avec d'autre génets de la même espèce. Cette structure de population est en accord avec les structures connues pour le genre *Suillus* (DAHLBERG & STENLID 1994, 1995), qui appartient aussi à la famille des Bolétacées, si l'on excepte *Suillus grevillei* dans une forêt du Japon (ZHOU *et al.* 1999).

Malgré le nombre considérable de spores produites par des fructifications abondantes, l'établissement de nouveaux génets ne semble pas intervenir fréquemment dans des populations s'établissant durablement. La capacité de produire des rhizomorphes du type le plus différencié (Figure 5), qui a été décrite pour les deux genres considérés ici (BRAND 1989), probablement favorise le maintien d'un système de translocation efficace dans un grand génet. Il semblerait donc qu'aussi bien *Suillus* que *Xerocomus* présentent la caractésistique commune de former à la

fois des rhizomorphes très différenciés et des génets de grande taille. Ces deux caractéristiques paraissent étroitement associées (OGAWA 1985, RAIDL 1997).

Contrastant avec ces résultats, la population de *Laccaria amethystina* est constituée de nombreux génets distincts, entremêlés et de petite taille (jusqu'à 13800 ha^{-1}). Seuls 4 % des génets ont fructifié plus d'une année, suggérant une forte mortalité. La taille supposée des génets souterrains semble petite, de quelques centimètres la plupart du temps.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par GHERBI *et al.* (1999) dans une hêtraie monospécifique à 1000 m d'altitude dans les Vosges. Dans cette forêt, les populations de *Laccaria amethystina* ont montré jusqu'à 5200 petits génets éphémères par hectare. Le renouvellement constant des génets peut se prêter à deux interprétations: soit la mortalité, suivie d'une recolonisation par un nouveau génet est très rapide, soit les génets se maintiennent mais ne fructifient pas chaque année, il s'agirait alors de génets "cryptiques" (GHERBI *et al.* 1999).

Cette dernière hypothèse s'est avérée une seule fois dans notre parcelle, le plus grand génet (S, coordonnées D2, D4) comprenait 13 sporophores, douze récoltés en 1999, et un en 1997. Ce génet, présent déjà en 1997, n'a donc pas fructifié en 1998. Il s'agit d'un cas non représentatif, puisque unique. 83 % des génets n'étaient constitués que par un seul sporophore.

Seuls 26 génets sur 209 sporophores analysés comprenaient plus d'un sporophore, dont neuf comprenaient 2 à 5 sporophore récoltés à la même date. Parmi les 17 génets ayant été retrouvés à plusieurs reprises, 11 ont fructifié pendant cinq à douze jours, et seulement 6 ont été retrouvés pendant deux ans. Ce nombre restreint ne nous a pas permis d'effectuer une étude phénologique.

Les nombreux génets de *Laccaria amethystina* nous paraissent être dus à un établissement à partir de spores, comme le suggère leur petite taille. Si l'on considère la dynamique racinaire, l'apparition de nouvelles racines (VOGT *et al.* 1986) offre des fréquentes opportunités pour de nouveaux colonisateurs (KRANABETTER & WYLIE 1998). Le mode de croissance de *Laccaria amethystina* suggère que les nouvelles radicelles soient colonisées par de nouveaux génets au fur et à mesure de leur apparition, en suivant la croissance de la racine longue.

Dans les situations où la compétition intraspécifique est forte, il serait logique de supposer une diversité clonale réduite, où seuls quelques génets plus compétitifs domineraient. Pourtant, une grande diversité génétique est observée, aussi bien à La Chanéaz que dans les Vosges. Il semblerait que dans ces deux cas aucun génet ne possède les capacités compétitives qui lui permettraient d'occuper une plus grande part du terrain au détriment des autres.

Le peu de similarité entre les profils RAPD et l'absence de corrélation significative du test de Mantel suggère que les génets de *Laccaria amethystina* proviennent de nombreux événements aléatoires distincts. Les spores assurant chaque nouvelle colonisation proviendraient d'une zone plus étendue que la surface prise en compte (50 m^2). Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec l'analyse de *Suillus grevillei* (ZHOU *et al.* 2001) qui a démontré que la répartition des allèles dans et entre populations se faisait à courte distance. Toutefois, certains allèles sont communs à des groupes spatialement rapprochés (le 752 par exemple), et sont en accord avec une provenance des spores d'un rayon de quelques centimètres à un mètre.

Les perturbations du sol, entraînant une hétérogénéité au niveau de microsites, ont été invoquées pour rendre compte d'une forte diversité génétique, chez les champignons saprophytes (FRANKLAND 1998) autant que chez les mycorhiziens (GUIDOT 2000, ZHOU *et al.* 1999). Il semblerait cependant que ce phénomène ne puisse être invoqué dans le cadre de notre étude, puisque les deux parcelles sont clôturées, ce qui exclut le piétinement invoqué par GUIDOT (2000) et ZHOU *et al.* (1999) ou les grands animaux fouisseurs. Dans le sol, il existe de toute manière des microsites différenciés, et la croissance des racines fournit constamment des opportunités de colonisation. Puisque, dans la même forêt et en conditions similaires, nous trouvons deux structures de populations différentes, d'autres facteurs que les perturbations créant une hétérogénéité dans les sites de colonisation doivent intervenir.

La diversité des structures génétiques rencontrées dans notre étude pour trois espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens nous amène à proposer un rôle plus important des caractéristiques biologiques intrinsèques spécifiques dans la structuration spatiale des populations que l'habitat ou l'âge de la forêt. Dans le § 8.3, nous allons formuler des hypothèses explicatives, à partir d'interprétations des études déjà réalisées, quant à la nature de ces caractéristiques spécifiques.

8.2 Avantages et limites des choix méthodologiques effectués dans ce travail

8.2.1 Peut-on baser une étude de génétique des populations uniquement sur les sporophores récoltés ?

Notre perception des peuplements de champignons est fortement dépendante du choix de la méthode d'observation utilisée. Etant donné le mode de vie particulier de ces organismes, qui croissent durablement dans le sol mais ne fructifient que de manière aléatoire et éphémère, des relevés exhaustifs semblent être irréalisables. La fructification varie fortement entre les années, et peut même être complètement absente certaines années, probablement en raison d'une augmentation de la température et d'une sécheresse estivale (STRAATSMA *et al.* 2001).

La récolte et l'identification des sporophores est la méthode la plus utilisée par les mycologues pour réaliser des inventaires d'espèces, essentiellement dans un but taxonomique, mais aussi écologique (STRAATSMA *et al.* 2001, SENN-IRLET &

BIERI 1999), et cette tâche est loin d'être terminée, puisque de nouvelles espèces sont encore régulièrement décrites (800 par année pour l'ensemble des champignons (HAWKSWORTH *et al.* 1995). Des listes rouges d'espèces menacées sont parues pour certains pays, notamment nordiques (Pays-Bas, ARNOLDS 1997) ou sont en préparation (France, COURTECUISSE 1991 ; Suisse, SENN-IRLET *et al.* 1997). Des études écologiques, faisant l'inventaire de biotopes particuliers (les forêts riveraines, SENN-IRLET 1997) ont été réalisées ou sont en cours. En utilisant ce moyen, l'évolution de la diversité dans différents milieux a été comparée (DEACON & FLEMING 1992) ou la régression de certaines espèces constatée (TERMORSHUIZEN & SCHAFFERS 1991, ARNOLDS 1991).

Des inventaires basés sur les récoltes de sporophores ne peuvent certifier l'absence de l'espèce au niveau des racines. De plus, les espèces hypogées sont difficilement recensées, de même que les espèces ne fructifiant pas, comme *Cenococcum geophilum* ou celles formant des fructifications difficiles à déceler, comme les Tomentelles et certains Ascomycètes. Or, il se trouve des ectomycorhiziens abondants parmi ces groupes, qui ne peuvent être négligés (ERLAND & TAYLOR 1999).

L'apparition des sporophores est aléatoire, de courte durée, saisonnière et fortement dépendante des conditions météorologiques. De ce fait, la fréquence et la durée des observations déterminent fortement le nombre d'espèces recensées : des relevés hebdomadaires à la réserve mycologique de La Chanéaz ont permis de détecter de nouvelles espèces chaque année pendant 21 ans (STRAATSMA *et al.* 2001) ! La perte d'information si la fréquence des récoltes passe d'hebdomadaire à mensuelle a été quantifiée (EGLI *et al.* 1997) : le nombre d'espèces recensées a diminué jusqu'à 39 %. Les mêmes auteurs insistent aussi sur la continuité de la méthode d'échantillonnage et du personnel. En effet, la reconnaissance des espèces est extrêmement difficile dans certains groupes, et des confusions sont fréquentes, aboutissant à une sous-estimation de la diversité.

En comparant l'abondance et la diversité obtenus par des relevés des mycorhizes et des fructifications, de nombreux auteurs concluent que ces derniers donnent une image fortement biaisée de la communauté (MEHMANN *et al.* 1995, GARDES & BRUNS 1996, DAHLBERG *et al.* 1997, JONSSON *et al.* 1999a, VAN DER HEIJDEN 2000) et préconisent de baser l'étude des communautés sur les mycorhizes plutôt que sur les sporophores.

Par contre, TERMORSHUIZEN & SCHAFFERS (1989) ont relevé une corrélation entre l'abondance des sporophores et celle des ectomycorhizes dans des parcelles de pins d'âges différents, alors que JANSEN (1991) a fait le même constat dans des parcelles de pins Douglas. Il faut aussi citer HORTON & BRUNS (2001), lesquels avancent que les grandes variations dans l'échatillonnage entre études contribueraient aux discordances observées entre diversité hypogée et épigée.

Les relevés basés sur les mycorhizes, s'ils donnent un reflet plus complet des communautés, présentent cependant des inconvénients. La première objection touche à la nature destructive de relevés de grande envergure : le prélèvement des racines

provoque des perturbations dans le sol, et lorsque des observations à long terme sont en cours, comme à la réserve de La Chanéaz, des relevés de ce type sont exclus. Par contre, la récolte des sporophores n'influence pas le mycélium sous-jacent (EGLI *et al.* 1990) et peut être poursuivie pendant plusieurs saisons au même endroit. Cependant, (PETER *et al.* 2001), par un échantillonnage précis et des prélèvements minimes (3 cm de racines par m^2 de sol), ont pu poursuivre une étude au niveau des mycorhizes pendant trois ans.

Une étude récente a montré que les mycorhizes étaient distribuées dans de sol de manière très irrégulière, et qu'un déplacement de quelques centimètres du prélèvement des racines influencerait dramatiquement les résultats de présence et d'abondance (BIDARTONDO *et al.* 2000). Des successions saisonnières des mycorhizes ont été constatées (cf. § 5.2.3.5). Pour donner une image exacte, les prélèvements de racines devraient de ce fait être effectués à plusieurs reprises pendant l'année (VAN DER HEIJDEN 2000), et selon une grille suffisamment dense pour ne pas manquer les espèces formant des petits génets.

Un autre inconvénient est lié aux méthodes de reconnaissance des mycorhizes. En effet, les morphotypes peuvent être identifiés par l'observation directe des racines prélevées, mais les taxa reconnus sont le plus souvent de rang élevé (famille ou genre). Pour pallier ce manque de précision taxonomique, différentes méthodes moléculaires peuvent être utilisées (cf. § 5.4.1). Même par ces méthodes, l'espèce ne peut être identifiée que si elle a déjà fructifié et a été analysée ou si elle est présente dans une banque de données moléculaire. Grâce à l'accroissement des données disponibles, l'observation simultanée des fructifications et des racines deviendra probablement routinière dans les prochaines années.

Toutes ces critiques concernent les relevés de richesse * et de diversité spécifique, au niveau des communautés. Notre étude porte sur des espèces clairement déterminées, dans un espace défini, et vise à établir la structuration spatio-temporelle des génets dont elles sont composées, au niveau des populations et non des communautés. Jusqu'à présent, la plupart des études au niveau intraspécifique ont été basées sur l'analyse de sporophores. Pour estimer un biais éventuel, l'échantillonnage simultané des sporophores et des mycorhizes d'*Hebeloma cylindrosporum* a été réalisé : même lorsque les populations sont fortement diversifiées, l'échantillonnage des sporophores donne une image correspondant aux mycorhizes trouvées au-dessous, que ce soit du point de vue de la diversité, de la répartition spatiale ou de la persistance des génets (GUIDOT *et al.* 2001).

La récolte des sporophores semble être par conséquent bien adaptée si l'objectif est de décrire la structuration spatio-temporelle d'une espèce, dans la mesure où elle permet des observations fréquentes sur plusieurs années. Néanmoins, il faudrait peut-être se limiter à extrapoler les résultats de (GUIDOT *et al.* 2001), obtenus pour *Hebeloma cylindrosporum*, uniquement aux espèces ayant les mêmes particularités. *Hebeloma* et *Laccaria* comptent parmi les genres qui dominent aussi bien dans les relevés souterrains que sur le sol, alors que pour *Cortinarius*, *Inocybe*, *Lactarius*, *Naucoria*, il n'y a pas de concordance entre les deux types de relevés (VAN DER

HEIJDEN 2000). Par conséquent, l'étude des populations de deux premiers genres cités pourrait être basée sur les sporophores sans introduire de biais.

La limite majeure liée aux récoltes de sporophores dans notre étude est l'impossibilité d'établir avec certitude les limites spatiales et temporelles des petits génets de *Laccaria amethystina* et leur répartition sur les racines. Cela aurait été possible par typage moléculaire des racines. L'ADN des champignons présents peut être amplifié, puis une diversité génétique recherchée par RFLP ou par séquençage. De même, des marqueurs spécifiques aux plantes ont été développés pour pouvoir identifier les racines (LINDER *et al.* 2000). Dans une forêt mixte comme celle de La Chanéaz, nous aurions pu identifier aussi les essences des arbres mycorhizés. Malheureusement, la densité de génets présents dans la parcelle où *Laccaria amethystina* a été étudiée exigeait un échantillonnage intensif, par conséquent trop destructif et incompatible avec les études en cours.

Nous aurions également aimé savoir si les génets de *Laccaria amethystina* présents sur une seule racine présentaient des réactions d'incompatibilité : l'isolement à partir de tissu de sporophores a échoué. Il aurait peut-être été possible de faire germer les basidiospores et d'isoler les différents pôles présents dans cette descendance haploïde, puis de les comparer à des types de référence, comme cela a été réalisé pour *Laccaria bicolor* (SELOSSE *et al.* 1996). Cela aurait apporté une information complémentaire sur la génétique de *Laccaria amethystina*, mais somme toute assez marginale par rapport à l'objectif initial.

8.2.2 Approche critique des méthodes moléculaires utilisées

L'extraction directe de l'ADN à partir des sporophores (WHITE *et al.* 1990), frais ou congelés, a permis de s'affranchir de l'étape de mise en culture, pendant laquelle un certain pourcentage de la récolte est perdu. Après l'extraction, les restes des sporophores ont été conservés à -20°, ce qui a permis des extractions ultérieures lorsque nécessaire, même après trois ans.

Trois types de marqueurs moléculaires ont été utilisés (cf. § 5.4.1 et § 6.4) :

- Les haplotypes obtenus par l'amplification de l'ITS ont été utilisés comme marqueurs spécifiques, permettant un contrôle supplémentaire de l'identité des champignons récoltés. Il n'a été obtenu qu'un seul fragment par espèce, de taille identique pour tous les échantillons d'une espèce, conformément aux attentes.

- Un polymorphisme des haplotypes de l'IGS nous a permis de distinguer les deux espèces de *Xerocomus*, alors qu'aucun polymorphisme intraspécifique n'a pu être détecté dans ce locus à l'intérieur de la parcelle d'étude pour ces deux espèces. Nous avons obtenu trois profils différents pour *Laccaria amethystina*, confirmant la variabilité intraspécifique de ce marqueur. L'équilibre de Hardy-Weinberg a pu être calculé sur ce locus à deux allèles.

- Les produits IGS 1 de PCR ont été soumis à des digestions par les enzymes *Hinf3* et *RsaI*. Aucun polymorphisme supplémentaire n'a été obtenu pour les deux

espèces de *Xerocomus*. Pour *Laccaria amethystina* seul deux haplotypes supplémentaires sont apparus, ce qui n'apportait pas d'information supplémentaire suffisante par rapport aux trois haplotypes de l'IGS 1. Par conséquent, la RFLP a été abandonnée très rapidement.

- La RAPD a mis en évidence un grand polymorphisme chez *Laccaria amethystina*, contrastant avec le profil unique obtenu pour les 146 *Xerocomus chrysenteron* et les 10 *X. pruinatus*. Une éventuelle diversité génétique a peu de chances d'échapper à cette méthode, d'autant plus que le nombre de fragments amplifiés est important. Sa relative simplicité en fait un outil de choix pour traiter un grand nombre d'échantillons.

La RAPD a été critiquée pour son manque de reproductibilité. Divers facteurs ont été testés, et les différences de température, dues aux thermocycleurs employés (PENNER *et al.* 1993, MEUNIER & GRIMONT 1993), ainsi que le type d'enzyme (TOMMERUP *et al.* 1995) ont été particulièrement invoqués. Cet inconvénient a été circonvenu par la méthode employée, mise au point par SELOSSE *et al.* (1998), soit une température d'hybridation aussi élevée que pour une PCR dirigée (50 °). Les résultats ainsi obtenus sont reproductibles, toutefois le plus grand soin doit être apporté à leur lecture. Toutes les opérations concernant les gels d'électrophorèse ont été strictement standardisées, ce qui a permis de comparer les gels entre eux.

Les profils obtenus sont donc interprétés comme une série d'allèles, qui ne peuvent être qu'absents ou présents, par conséquent considérés comme dominants. L'analyse génétique est de ce fait limitée, puisque l'on ne peut pas distinguer les homozygotes des hétérozygotes, ni mesurer la diversité génétique en se basant sur des loci à plusieurs allèles. L'équilibre de Hardy-Weinberg ne peut être calculé, ni une structuration en sous-populations, ni le flux de gènes. De plus, toutes les analyses génétiques supposent des marqueurs indépendants les uns des autres : or, rien ne nous permet d'affirmer que certains des fragments amplifiés ne soient pas situés à proximité les uns des autres sur un chromosome, et par conséquent liés.

Les données composées de marqueurs dominants peuvent être analysées, mais leur résolution statistique est inférieure à celle des marqueurs codominants. C'est pourquoi à la fois l'échantillonnage et le nombre de loci considéré doit être plus grand que pour la RFLP (LYNCH & MILLIGAN 1994). Notre étude s'est efforcée de répondre à ces critères. Nous avons obtenu de nombreux marqueurs : 13 pour les deux espèces de *Xerocomus* et 59 pour *Laccaria amethystina*. Notre échantillonnage était suffisant, puisque pour des méthodes générant plusieurs allèles par loci, 30 individus sont suffisants (MCDONALD 1997), et nous avons analysé 209 *Laccaria amethystina*.

Pour *Xerocomus chrysenteron*, dont les 146 sporophores analysés formaient un seul génet, il est intéressant de calculer la probabilité que deux sporophores ne soient pas identiques, mais appartiennent à des générations successives, dans lesquelles il y aurait eu recombinaison génétique. Pour cela, il faut considérer la probabilité d'hériter d'un marqueur dominant, qui est de 75 %. La probabilité d'hériter d'une

S.C.D. - U.H.P. NANCY
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY

combinaison de 13 marqueurs dominants est par conséquent de $(0.75)^{13} = 0.024$, soit une probabilité très faible.

Nous avons établi une matrice de similarité entre les profils obtenus pour chaque *Laccaria amethystina* analysé. Les coefficients de distance ou de similarité ont été choisis parmi ceux qui ne tenaient compte que du nombre de marqueurs (dans ce cas, de fragments d'ADN ayant migré de manière identique dans un gel d'électrophorèse) que chaque champignon a en commun ou non avec un autre. Un coefficient comme celui de NEI (1972) était contre indiqué. En effet, il est basé sur la fréquence de chaque allèle. Or, les fréquences des allèles étaient pour la plupart très basses, puisque nous avions obtenu un très grand nombre de marqueurs présents seulement à quelques reprises et l'ensemble des fréquences des marqueurs n'avait pas une distribution normale (Figure 29).

A partir de la matrice de similarité obtenue, on peut dégager des tendances en interprétant l'histogramme des fréquences des indices de similarité (Figure 32). L'absence d'une distribution bi-modale indique qu'il n'y a pas deux sous-populations. Une population constituée d'individus très apparentés entre eux verrait sa moyenne déplacée vers les indices hauts. Or, l'histogramme des fréquences suit la courbe normale, ce qui indique que la reproduction se fait au hasard.

La matrice de similarité sert de base à des vérifications statistiques plus poussées. Nous avons choisi de montrer un dendrogramme regroupant graphiquement les groupes apparentés (NJ), ce qui permet d'observer d'éventuels regroupements, et de les situer spatialement et temporellement. L'observation du dendrogramme confirme que la population n'est pas structurée en sous-populations, et que le degré de similitude génétique est moyen. Dans le cas de *Laccaria amethystina*, aucune sous-population clairement détachée des autres n'a pu être mise en évidence, ni par l'histogramme des fréquences des indices de similarité, ni par le dendrogramme, malgré la présence diffuse de quelques regroupements à plus forte similarité que la moyenne.

Il était intriguant de savoir s'il existait une relation entre les distances spatiales et génétiques chez *Laccaria amethystina* : pour ce faire, nous avons effectué un test de Mantel, mettant en relation deux matrices de distance par des permutations aléatoires. Aucune corrélation significative n'a pu être trouvée. La similarité génétique ne décroît pas avec l'augmentation de la distance spatiale, dans les limites de cette station restreinte. Il existe quelques groupes génétiquement et spatialement proches (Figure 33 et Figure 34), indiquant que la reproduction sporale se fait à courte distance, mais ils constituent des exceptions. Le brassage génétique important suggère que les spores proviennent essentiellement de l'extérieur de la parcelle étudiée, où *Laccaria amethystina* fructifie d'ailleurs abondamment, comme nous avons pu l'observer en trois ans de récoltes intensives.

Ainsi, le choix de la RAPD comme outil moléculaire a répondu au but fixé, à savoir établir une répartition spatiotemporelle des génets dans les parcelles choisies. Comme nous souhaitions un échantillonnage précis et exhaustif dans une parcelle limitée, cette méthode était indiquée à cause de sa rapidité d'exécution.

Une prolongation de la RAPD consiste à séquencer des allèles présents dans tous les profils, et comparer les séquences entre elles (SCARs Sequence Characterized Amplified Region, séquençage de certains produits d'amplification de RAPD). Les marqueurs ainsi obtenus sont codominants, et se prêtent à une analyse génétique plus fine (cf. § 5.4.1). De plus, ils peuvent être testés comme amorces spécifiques à un génet donné, et utilisés pour les situer directement à partir d'échantillons de sol ou sur les mycorhizes. Nous pensons qu'une telle suite devrait être donnée à notre travail.

Des méthodes alternatives auraient pu être utilisées. L'AFLP, notamment, couplée avec le séquençage d'un choix de fragments obtenus (cf. § 5.4.1) aurait permis de générer des marqueurs codominants. Malheureusement, elle n'était pratiquée dans aucun des deux laboratoires fréquentés au début de travail.

8.2.3 Pertinence de l'échantillonnage

Par rapport à la plupart des études présentées au § 5.4.2, notre inventaire offre plusieurs avantages : les récoltes sont exhaustives et spatialement continues, ce qui permet d'inférer la continuité du mycélium sous-jacent. De plus, le nombre de champignons récoltés et analysés est important. Sa durée, bien que limitée à trois ans, intègre la notion temporelle.

Au niveau de l'échantillonnage, les aires d'étude peuvent sembler trop limitées. Cela se justifie par l'existence de parcelles cloisonnées et quadrillées au sol, avantage certain lorsque l'on veut situer les champignons récoltés avec une précision de quelques centimètres. Ce choix s'est avéré judicieux en ce qui concerne *Laccaria amethystina*. En effet, nous avons pu repérer de nombreux petits génets, montrer que deux sporophores adjacents pouvaient être génétiquement différents et que des sporophores appartenant à des génets différents pouvaient se succéder en l'espace d'une saison au même emplacement.

Par contre, en ce qui concerne les deux espèces de *Xerocomus*, la méthode employée par BONELLO *et al.* (1998), qui consiste à récolter les sporophores sur de grandes surfaces, de manière moins intensive, aurait permis de cerner les limites des grands génets présents à La Chanéaz. Une unique tentative, en 2000, de récolter des *Xerocomus* autour de la parcelle 47, nous fait supposer que l'unique génet de *Xerocomus chrysenteron* s'étendait en tout cas de manière continue sur la parcelle adjacente de 100 m2, et peut-être aussi en direction opposée, le long d'une diagonale de 110 m. Ce n'est pas le cas du génet de *Xerocomus pruinatus*, qui était entouré de plusieurs génets différents. Dans les deux cas, les génets répertoriés semblent être âgés de plusieurs dizaines d'années.

Une analyse au niveau des racines aurait permis de mieux cerner les dimensions des génets, et connaître avec certitude leur durée de vie, comme cela a été établi pour *Hebeloma cylindrosporum* (GUIDOT *et al.* 2001). L'utilisation d'amorces amplifiant sélectivement l'ADN des taxa recherchés permet d'effectuer les extractions directement à partir de racines mycorhizées ou d'hyphes extraracinaires. Ces amplifiats peuvent ultérieurement être traités de manière à générer des marqueurs codominants, ce qui a été réalisé par GUIDOT (2000). Nous avons mentionné au §

8.2 que cette approche aurait généré des perturbations inadmissibles dans nos parcelles d'étude.

Puisque l'avenir semble être aux études basées sur les récoltes de mycorhizes, et que ces observations sont fortement dépendantes des fréquences et distances relatives des prélèvements (cf. HORTON & BRUNS 2001), nous espérons avoir fourni une information appréciable, qui permettra une bonne adaptation des grilles d'échantillonnage aux tailles des génets souterrains des trois espèces dont il est question dans cette étude.

Le choix des espèces a été motivé par plusieurs considérations. Tout d'abord, il semblait important de retenir des espèces comestibles, puisque la réserve mycologique de La Chanéaz offrait l'opportunité d'une récolte sans concurrence. D'autre part, les résultats obtenus pouvaient servir à orienter les différentes mesures à prendre dans le cadre de la protection des champignons.

Plus particulièrement, *Laccaria amethystina* a été choisi car il avait fait l'objet d'une étude dans le massif vosgien en 1997, et il semblait intéressant de pouvoir comparer les deux jeux de données. En effet, rien ne permettait d'affirmer que des populations de *L. amethystina* auraient présenté la même structuration génétique dans deux habitats différents (forêt monospécifique et forêt d'essences mêlées).

Aucune étude de génétique des populations n'avait été réalisée jusqu'alors sur le genre *Xerocomus*. Nous disposons de données sur trois espèces du genre *Suillus*, appartenant aussi à la famille des Boletaceae, présentant des structures de populations différentes. En sachant que des espèces d'un même genre peuvent révéler des populations peu ou au contraire hautement diversifiées, il était intéressant d'étendre nos observations à un genre proche.

8.3 Questions d'actualité en matière de populations de champignons ectomycorhiziens

Malgré les formidables espoirs suscités par l'utilisation de techniques moléculaires, la génétique des populations forestières des champignons ectomycorhiziens en est encore au stade des balbutiements. Alors que la reconnaissance de la diversité génétique et physiologique est une avance significative en elle-même, leur importance dans le fonctionnement de l'écosystème doit encore être évaluée (HORTON & BRUNS 2001, MARTIN 2001). Prises dans leur ensemble, les études détaillées ci-dessus (voir § 5.4.2) sont souvent parcellaires, insuffisantes dans la durée et l'espace considéré. De ce fait, les résultats sont trop souvent anecdotiques, ne s'appliquent qu'au milieu ou à l'espèce particuliers et ne peuvent être généralisés. Aucun modèle proposé jusqu'à présent ne permet d'apporter une explication globale.

La distinction entre espèces des stades précoces et tardifs, nous l'avons vu, n'est pas toujours aisée, et certaines espèces classées dans l'une ou l'autre catégorie se sont révélées être multi-stades. De plus, des espèces considérées comme appartenant à des genres colonisateurs, *Hebeloma cylindrosporum* et *Pisolithus* spp, peuvent s'établir durablement dans un milieu particulier, en formant des génets de taille moyenne

(GUIDOT 2000, ANDERSON *et al.* 2001). S'il est évident que les espèces pionnières doivent présenter des aptitudes à la colonisation, comme une forte production de spores, une capacité d'installer rapidement un mycélium fonctionnel, il n'est pas encore prouvé que ces caractéristiques s'assortissent forcément d'une compétitivité réduite (ANDERSON *et al.* 2001).

L'attribution aux espèces de stratégies rudérale (sélection R) ou compétitives (K, C ou S) (cf. § 5.3.1) s'excluant mutuellement est de ce fait un modèle qui ne semble pas généralisable tel quel au mode de vie particulier des champignons. En effet, au moins deux espèces ont montré des caractéristiques combinant des stratégies R et S (*Suillus pungens,* BONELLO *et al.* 1998, et *Xerocomus chrysenteron*, dans la présente étude) ; ces espèces produisent à la fois de nombreux sporophores (stratégie reproductive) et s'établissent durablement en formant de grands génets qui ne se chevauchent pas (stratégies compétitive et résistante au stress).

La structuration en petits génets et la colonisation par les spores n'est pas nécessairement caractéristique des espèces fongiques occupant les plantations ou les forêts jeunes. Dans les forêts matures, on peut trouver des petits génets jouxtant des plus étendus (p. ex. *Suillus pungens, Cortinarius rotundisporus, Suillus variegatus*), et des populations uniquement composées de petits génets (p. ex. *Laccaria amethystina*, *Amanita francheti*, *Lactarius xanthogalactus* et *Russula cremoricolor*) (Tableau 3). L'accroissement de la taille des génets avec le vieillissement de la forêt, confirmé dans le cas étudié par DAHLBERG et STENLID (1990, 1994) pourrait être limité aux espèces fongiques formant des mycélia étendus, comme *Suillus bovinus*, croissant des forêt d'âge homogène. Pour d'autres espèces, la taille des génets ne s'accroît pas avec l'âge des arbres, citons comme exemple les populations spontanées de *Laccaria laccata* et *L. bicolor* (SELOSSE *et al.* 1999).

L'ensemble des observations effectuées ne permet pas d'établir un modèle unique reliant strictement la structuration génétique des champignons ectomycorhiziens à l'âge de la forêt, donc des arbres-hôtes.

Si l'on examine les observations et les hypothèses rapportées dans les différentes études (cf. § 5.3.2 et § 5.4.2), d'autres tentatives d'explication peuvent être avancées. Elles se réfèrent à des caractéristiques biologiques ou génétiques intrinsèques de l'espèce considérée ou à des facteurs extrinsèques, liés au milieu.

8.3.1 Influence du milieu sur la structuration des populations ectomycorhiziennes

La caractéristique d'*Hebeloma cylindrosporum* est l'adoption de stratégies différentes en fonction du milieu (GUIDOT 2000). L'auteur avance quelques hypothèses pour expliquer la diversité de la structuration spatiale, compte tenu de l'écologie de l'espèce : ce serait une espèce "fugitive", c'est-à-dire peu adaptée à la compétitivité interspécifique. Dans les dunes côtières de l'Atlantique, milieu extrême donc peu riche en espèces, *Hebeloma cylindrosporum* peut survivre plus longtemps, et développer des génets plus étendus. Dans la pinède, les génets soumis à une concurrence interspécifique accrue durent en général moins d'une saison. Le

SCD NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

renouvellement intense des génets s'expliquerait par l'apport continu de spores provenant des colonies adjacentes, qui profiteraient de l'existence de microsites - générés par les perturbations - favorables à leur implantation.

Dans ce sens, il ne s'agirait pas vraiment d'une double stratégie adoptée par l'espèce, mais subie : des facteurs extrinsèques, liés aux caractéristiques du sol de pinède, des perturbations ou la concurrence interspécifique, détermineraient cette différence de structuration. La capacité d'*Hebeloma cylindrosporum* à former de grands génets serait donc bien une caractéristique intrinsèque de cette espèce, génétiquement déterminée, mais accomplie uniquement dans les sites répondant aux exigences écologiques de l'espèce.

Quant au genre *Suillus*, pour lequel des résultats contrastés ont été obtenus, il a été avancé que la formation de petits génets de *Suillus grevillei* serait elle aussi due à des perturbations anthropiques dans la forêt étudiée (ZHOU *et al.* 1999). Mais on ne peut pas exclure que cette espèce adopte une stratégie différente des autres *Suillus* étudiés, en raison de particularités biologiques propres. Elle présente la caractéristique d'être exclusivement liée au mélèze, et manque rarement sous cette essence, qu'elle croisse naturellement ou non, même en plaine. Cette relative indifférence aux facteurs climatiques ou du sol suppose une dépendance très étroite au mélèze : une répercussion sur la structure génétique des populations et leur permanence n'est donc pas exclue. Les autres espèces de *Suillus* étudiées (cf. Tableau 3) ont un spectre d'hôte plus large, liées à la famille des *Pinaceae*.

ANDERSON *et al.* (2001) ont révélé une structuration très disparate dans les populations de *Pisolithus* spp étudiées le long d'une route. La taille des génets trouvés s'échelonne entre quelques cm^2 et 120 m^2. Les auteurs supposent une double stratégie, à la fois rudérale et tolérante au stress, pour ces espèces. Le grand nombre de spores produites et la croissance en zones perturbées ou en plantations suggèrent une stratégie rudérale, alors que les grands génets et les rhizomorphes présents dans le mycélium extraracinaire sont caractéristiques d'une stratégie résistante au stress.

De ce fait, ANDERSON *et al.* (2001) supposent que les grands génets ont pu profiter de sites non-perturbés, alors que les petits génets se sont installés récemment grâce à des "fenêtres d'opportunité" provoquées par la fouille des fourmis. En ce sens, leurs conclusions rejoignent celles de GUIDOT (2000) sur *Hebeloma cylindrosporum*, qui forme des petits génets en milieu perturbé. Il faut par contre relever que l'observation des *Pisolithus* spp. n'a porté que dans un seul habitat.

La structuration d'une population en une mosaïque de petits génets ne doit pas forcément être attribuée à la présence de "fenêtres d'opportunité". En effet, les racines croissent indéfiniment, proposant continuellement aux champignons de nouveaux sites d'infection (cf. § 5.1.4). La présence de nombreux petits génets, voire d'espèces et même de types mycorhiziens différents sur un même tronçon de racine (PEROTTO *et al.* 1996, GUIDOT 2000, VAN DER HEIJDEN 2000) indique que la rhizosphère ne constitue pas un milieu fermé, même dans les forêts matures. Les perturbations pourraient constituer un facteur supplémentaire de probabilité pour

l'implantation de nouveaux génets, en provoquant la dégénérescence de fraction mycéliennes, conduisant à des génets dont la taille ne reflète pas l'ancienneté.

L'influence de la variabilité génétique des deux symbiontes dans l'établissement, le maintien et la disparition de la mycorhize n'a pas été abordée. VAN DER HEIJDEN (2000) a pourtant relevé que la diversité génétique de *Salix repens* avait un effet sur la symbiose, en interaction avec le type de sol. Il est vrai que la vérification expérimentale d'une telle hypothèse dans des études de génétique des population, sur un vaste échantillonnage, demanderait un investissement important. C'est peut-être dans ce domaine qu'il faudrait rechercher les causes de la disparité des tailles des génets, lorsque les perturbations du sol ne paraissent pas la justifier.

> Au moins deux taxa rudéraux (*Pisolithus* spp. et *Hebeloma cylindrosporum*) se montrent capables d'établir des génets persistants de taille moyenne à grande, à proximité de populations composées de génets petits et éphémères. Les perturbations du milieu comme le piétinement ou la fouille et la croissance dans un habitat sub-optimal ont été invoquées pour justifier l'existence de petits génets éphémères chez ces espèces capables de former de grands génets persistants.
>
> Aucune de ces deux hypothèses ne permettrait d'expliquer la structuration génétique de *Laccaria amethystina* observée à La Chanéaz. En effet, la parcelle d'étude est à l'abri des grandes perturbations, nous n'avons pas constaté de traces de fouille au sol pendant trois ans. La forte productivité de *Laccaria amethystina* dans toute la réserve mycologique de La Chanéaz nous fait écarter l'hypothèse d'un habitat sub-optimal. De plus, aucun génet de taille importante n'a encore été observé chez cette espèce, ni à La Chanéaz, ni à Aubure (GHERBI *et al.* 1999). L'influence des deux milieux observés n'est pas perceptible sur la structure des populations des *Laccaria amethystina*.

8.3.2 Influences intrinsèques, physiologiques et morphologiques sur la structuration des populations ectomycorhiziennes

D'après (RAYNER *et al.* 1999), le mycélium ne doit pas être considéré comme une unité discrète, mais comme un système durable du point de vue thermodynamique, dont les différents compartiments sont séparés par des frontières changeantes, aussi bien du point de vue spatial que temporel. La dynamique des frontières peut être illustrée par l'ouverture des frontières en phase de croissance et d'assimilation, par l'anastomose des hyphes (fusion de frontières) en phase de résilience, par l'isolement de fragments mycéliens, comme lors de la production de conidies ou de sclérotes (fermeture de frontières), ou par le transfert des ressources vers les zones les plus actives du mycélium, au détriment des zones dégénérescences (redistribution de frontières).

Dans cette perspective systémique, l'expression des gènes semble être fortement influencée par l'environnement souterrain et la racine de l'hôte (CAIRNEY & BURKE 1996). La plasticité phénotypique résultante permet aux mycélia de moduler leurs activités à travers des niches extrêmement variables et d'exploiter les ressources du milieu tout en se protégeant d'agressions extérieures (RAYNER *et al.* 1999).

Lorsque les mycélia atteignent des tailles importantes, la question se pose de savoir comment les ressources sont acheminées sur de telles distances. Certaines espèces

forment des génets de très grande taille. BONELLO *et al.* (1998) proposent une stratégie combinant les caractéristiques rudérale, compétitive et tolérante au stress pour les espèces du genre *Suillus*, dont *Suillus pungens* a établi le génet le plus grand recensé jusqu'à présent chez une espèce ectomycorhizienne. Ce seraient des compétiteurs capables de persister dans le temps et l'espace tout en maintenant un grand potentiel reproductif.

La combinaison de ces facteurs suppose un besoin accru en carbone, dont la provenance semble limitée par le faible pourcentage de mycorhizes formées par cette espèce (3 %) par rapport aux nombreuses fructifications produites par *Suillus pungens* (GARDES & BRUNS 1996). BONELLO *et al.* (1998) formulent trois options - cumulatives et non-exclusives - pour en expliquer la provenance :

1) *Suillus pungens* serait très efficace dans le prélèvement des composés carbonés chez son hôte, et peu de mycorhizes seraient suffisantes pour un transfert important,
2) des génets de grande taille seraient plus efficaces dans l'accumulation du carbone, en établissant des connexions avec plusieurs arbres à la fois,
3) une fraction du carbone serait obtenue par dégradation de la matière organique de la litière (capacité saprophytique élevée).

Les nombreux rhizomorphes produits par *Suillus pungens* parlent en faveur de la deuxième hypothèse (BONELLO *et al.* 1998). En comparaison, *Russula amoenolens* et *Tomentella sublilacina*, deux espèces présentes abondamment dans la rhizosphère du même site de Point Reyes, fructifient rarement : elles ne forment pas de rhizomorphes. Des arguments en faveur des première et troisième hypothèses pourraient être obtenus de manière expérimentale.

Cortinarius rotundisporus (SAWYER *et al.* 1999) forme aussi de grands génets. Aucune différence dans la structuration génétique n'a pu être mise en relation avec des différences de végétation. Les auteurs insistent plutôt sur l'existence de rhizomorphes, capables de maintenir le mycélium durablement en le protégeant du stress édaphique. Les rhizomorphes sont considérés comme les facteurs primordiaux de la modification temporelle des schéma de transport. Cette plasticité fonctionnelle permet l'adaptation à la diversité d'activités physiologiques requises dans un sol hétérogène.

La présence de rhizomorphes dans le mycélium extraracinaire est invoquée par différents auteurs (BONELLO *et al.* 1998, SAWYER *et al.* 1999, ANDERSON *et al.* 2001, REDECKER *et al.* 2001) comme une cause probable de la formation et du maintien de grands génets, permettant de créer un véritable réseau d'arbre en arbre. Ce sont les rhizomorphes qui pourraient justifier aussi bien la première que la deuxième hypothèse avancée par BONELLO *et al.* (1998), en tant qu'agents permettant le transport efficace du carbone.

Xerocomus chrysenteron possède des rhizomorphes du type le plus différencié (Figure 5 et Figure 20), ainsi que les espèces du genre *Suillus*. Cette espèce fructifie abondamment dans la parcelle 47, tout comme dans la forêt avoisinante. De ce fait,

l'attribution d'une stratégie tolérante au stress et compétitive, opposée à une stratégie privilégiant la reproduction sexuée (rudérale), ne nous semble pas appropriée. De plus, ces stratégies, modèles élaborés à partir d'observations du milieu naturel, ne sont pas explicatives ; elles ne permettent pas d'inférer les causes de l'étendue et de la longévité des génets de *Xerocomus chrysenteron*.

Les trois hypothèses formulées par BONELLO *et al.* (1998) peuvent être rapportées à *Xerocomus chrysenteron* et *Xerocomus pruinatus*. Notre étude, en l'absence de prolongement expérimental sur la physiologie de *Xerocomus* spp, ne nous permet pas de nous prononcer sur les première et troisième hypothèses. Un mycélium extraracinaire produisant des rhizomorphes différenciés, décrit chez *Xerocomus chrysenteron* nous permet de considérer la deuxième hypothèse comme hautement probable.

Nous rejoignons ainsi les incitations de NEWTON (1992) à rechercher les critères explicatifs dans les caractéristiques fonctionnelles du mycélium. En recoupant les observations d'OGAWA (1985) et d'AGERER (1987-1998, 1991) (Figure 5), nous pouvons penser que *Xerocomus chrysenteron* forme des «petites colonies dispersées» (Figure 11, § 5.3.2), reliées entre elles par des rhizomorphes différenciés, explorant le sol sur des distances importantes aussi bien verticalement qu'horizontalement. Ce type de mycorhizes, les plus développées, modifient l'architecture racinaire en augmentant les branchements, ce qui a pour effet d'accroître la probabilité de coloniser des sites proches, et probablement l'efficacité de la mycorhize elle-même.

Si l'on considère les espèces formant des petits génets, *Hebeloma cylindrosporum*, qui ne forme pas de rhizomorphes, ne s'étend pas autant : en cinq ans, sa distribution est restée voisine de la surface initialement occupée (GRYTA *et al.* 1997, 2000, GUIDOT 2000). De plus, les génets ont une taille d'environ 20 m^2, ce qui représente tout de même une surface bien inférieure aux 200 à 300 m^2 couverts par les génets de *Suillus variegatus* (DAHLBERG 1997), *S. pungens* (BONELLO *et al.* 1998) et *Cortinarius rotundisporus* (SAWYER *et al.* 1999).

Le genre *Laccaria* forme des rhizomorphes du type le moins différencié (Figure 5 et Figure 20). Or, les génets répertoriés n'atteignent pas de grandes tailles (cf. Tableau 3, Figure 15 et Figure 33). Ces génets sont en général composés d'un seul sporophore ou ne regroupent que quelques sporophores. En de référant à la description d'OGAWA (1985), nous pensons que les mycorhizes de *Laccaria* ne modifient pas autant l'architecture racinaire que les espèces formant des rhizomorphes différenciés, et sont incapables de s'éloigner des racines mycorhizées, aussi bien verticalement qu'horizontalement. Par contre, la capacité à persister, même si elle n'est pas systématiquement exploitée, semble bien exister (DE LA BASTIDE *et al.* 1994, GHERBI *et al.* 1999, SELOSSE *et al.* 1998, 1999 et nos propres observations).

L'étude portant sur trois espèces des genres *Amanita*, *Russula* et *Lactarius* vient confirmer l'importance de caractéristiques morphologiques dans l'implantation de grands génets. (REDECKER *et al.* 2001) concluent que la propagation par les spores, dans les forêts intactes, natives et climaciques, joue un rôle plus important qu'on ne le supposait chez des espèces du stade tardif. Ainsi, la présence de petits génets ne

serait pas liée uniquement à l'apparition de "fenêtres d'opportunité" dans les forêts matures. Ils invoquent d'autres causes pour expliquer cette distribution : des rhizomorphes différenciés sont développés dans ces genres qui forment des grands génets, comme *Armillaria*, *Suillus* et *Cortinarius*, alors que chez *Russula*, *Lactarius* et la plupart des *Amanita*, on trouve des rhizomorphes à structure simple ou pas de rhizomorphes du tout (REDECKER *et al.* 2001).

> Au terme de cette analyse, il semblerait donc que les espèces produisant les rhizomorphes les plus différenciés forment les génets les plus étendus et les plus durables : *Suillus* spp., *Cortinarius rotundisporus* et *Xerocomus chrysenteron*. Parmi les espèces formant des rhizomorphes peu différenciés, *Laccaria*, *Lactarius* et *Hebeloma* ne forment que des petits génets, dont certains sont capables de persister plusieurs années. La complexité d'organisation du mycélium serait le meilleur prédicteur de la taille que les mycélia vont pouvoir atteindre en conditions optimales. La grande taille, mais non la persistance, serait donc liée au degré de différenciation atteint par les hyphes.

8.3.3 Questions sur la longévité des génets du genre Laccaria

La longévité d'un génet ne paraît pas forcément liée à sa taille. Nous avons vu que des petits génets spontanés de *Laccaria bicolor* et *L. laccata* peuvent subsister quelques années sans accroissement notable (SELOSSE *et al.* 1999). Or, COUTTS & NICHOLL (1990a) constatent la disparition du mycélium de *L. laccata* pendant l'hiver. D'autre part, une partie non négligeable des génets, voire la majorité chez *Laccaria amethystina*, ne survivent pas d'une année à l'autre (GHERBI *et al.* 1999). Deux hypothèses contradictoire peuvent être avancées :

1) Les génets se maintiendraient durablement, sans fructifier chaque année. Cette hypothèse a été émise par GHERBI *et al.* (1999).
2) Les génets seraient associés aux mycorhizes actives. Cette explication a aussi été avancée par DE LA BASTIDE *et al.* (1995) et DAHLBERG *et al.* (1997), et prouvée pour *Hebeloma cylindrosporum* croissant en forêt (GUIDOT 2000).

En faveur de la première hypothèse, nous pouvons mentionner les quelques génets persistants, révélés aussi bien par GHERBI *et al.* (1999) que par nous-mêmes, quoique de manière sporadique. Il resterait à savoir sous quelle forme le mycélia persiste pendant la mauvaise saison, en sachant que *Laccaria* ne forme pas de rhizomorphes différenciés, et des mycélia de taille réduite. La présence de propagules telle que fragments mycéliens ou vielles mycorhizes a été décrite par GARBAYE (1991), cf. § 5.1.3).

Les observations de (MAJDI *et al.* 2001) sur la longévité très différente des mycorhizes en fonction de leur position sur la racine et dans le sol pourraient être exploitées. Seules les mycorhizes des racines émergeant directement de la racine primaire, sans branchements et à une profondeur les mettant à l'abri du gel survivent jusqu'à deux ans (cf. § 5.1.4). Une étude de la diversité génétique des mycorhizes serait nécessaire pour répondre avec certitude à cette question.

Si l'on accepte la deuxième hypothèse, les génets de *Laccaria amethystina* s'éteindraient avec la mycorhize, sans avoir pu s'étendre à d'autres racines, en raison de limites imposées par la structure simple du mycélium.

Les observations effectuées sur les mycélia dans des rhizotrons (*root chamber system*) peuvent apporter un éclairage significatif. *Laccaria amethystina* forme des rhizomorphes peu différenciés, identiques à ceux de *Laccaria bicolor*, qui ont été décrits par RAIDL (1997). Le système mycélien de *L. bicolor* est réduit à quelques centimètres de diamètre. Il est composé de rhizomorphes irrégulièrement ramifiés et interconnectés, qui sont toujours entourés par des tapis mycéliens (*mats*). D'après ces observations, *Laccaria amethystina* ne formerait pas des mycélia de taille importante (RAIDL 1997). Il s'agirait là d'une caractéristique génétiquement déterminée de l'espèce.

Les génets de petite taille sont soumis à des contraintes particulières. Une forte densité d'individus partageant un même substrat peut avoir un effet sur les populations, par compétition quant aux ressources. Si une racine est colonisée par de nombreux génets, de taille réduite et somatiquement incompatibles entre eux, aucun ne parviendra à occuper suffisamment de territoire pour assurer une fructification abondante, et verra sa fertilité réduite (RAYNER *et al.* 1984). Comme la probabilité de coloniser de nouvelles radicelles et donc de survivre est plus grande dans un domaine plus large, on peut supposer que la mortalité dépendant de la densité est plus importante chez les génets de taille réduite (WORRAL 1999).

La structure spatiale observée pour *Laccaria amethystina* en hêtraie (Aubure, Vosges) et en forêt mixte (La Chanéaz, Fribourg) s'accorde avec cette hypothèse : les génets de taille réduite n'ont qu'une durée de vie courte. Ainsi, *Laccaria amethystina* semble former des génets qui s'étendent peu au-delà de la mycorhize, et meurent avec la sénescence des cellules du réseau de Hartig. Les radicelles qui croissent à proximité ne sont pas colonisées par les génets déjà établis, mais par des mycélia dicaryotiques issus de spores.

Il semblerait donc que seuls les génets trouvant des conditions favorables à leur permanence puissent survivre d'une année à l'autre. L'énorme quantité de génets petits et très proches exclut une telle possibilité pour tous. La présence de rares génets persistant plus d'un an qui ont été trouvés aussi bien dans les Vosges qu'à La Chanéaz pourraient être interprétés comme :

- des individus génétiquement aptes à survivre durablement, alors que la majorité des génets de *L. amethystina* ne possède pas ou à un moindre degré, ces aptitudes,
- un micro-environnement créant des conditions favorables à cette survie, comme la profondeur des racines mycorhizées dans le sol,
- une association plante-hôte autorisant la persistance. Des caractéristiques physiologiques aussi bien de l'arbre que du génet du champignons pourraient être à l'origine de cette particularité.

8.3.4 Apport à une stratégie ciblée de protection des champignons

La régression des espèces mycorhiziennes en Europe a été constatée à plusieurs reprises (TERMORSHUIZEN & SCHAFFERS 1991, ARNOLDS 1991). Une des causes possibles pourrait être la cueillette intensive, bien que cette option soit mise en doute par ARNOLDS (1995), qui attribue le déclin des champignons comestibles à la pollution croissante. Rien ne permet d'affirmer que la cueillette soit néfaste pour la fructification successive. Les résultats expérimentaux conduits à moyen terme à la réserve mycologique de La Chanéaz ont montré que le ramassage n'avait pas d'influence statistiquement démontrable sur les quinze espèces étudiées (EGLI *et al.* 1990). D'autre part, la régression touche l'ensemble des espèces ectomycorhiziennes, et non les espèces comestibles en particulier (ARNOLDS 1995).

Le rôle des spores dans le développement des populations n'est pas encore clair. Les méiospores des Basidiomycètes ectomycorhiziens pourraient jouer un double rôle. Bien que leur fonction première soit d'assurer la dispersion de l'espèce par la conquête de nouveaux substrats, elles pourraient également assurer un flux génétique entre mycélia. La capacité des monocaryons issus de la germination d'une spore de coloniser les mycélia dicaryotiques par le phénomène de Buller a été clairement établie pour les Basidiomycètes in vitro (EGGER 1994).

Le renouvellement génétique des anciens mycélia a été considéré comme nécessaire sur la base d'observations in vitro ou en culture. Les champignons en culture montrent rapidement des signes d'altération du métabolisme, ne produisent plus de substances secondaires et finissent par devenir stériles (WATLING 1971), bien que certaines cultures puissent persister longtemps (DI BATTISTA *et al.* 1996). Ce phénomène de sénescence serait dû à un appauvrissement génétique du mycélium (EGGER 1994).

Des cueillettes intensives de sporophores sur de grandes étendues, en limitant le nombre de spores à disposition, pourraient empêcher ce "rafraîchissement" mycélien, et donc perturber la survie à long terme des espèces comestibles. L'étude expérimentale réalisée à La Chanéaz (EGLI *et al.* 1990) sur des petites parcelles immergées en forêt ne permet pas d'évaluer cet éventuel impact.

Dans les régions où l'impact de la cueillette est extrêmement prégnant, comme dans les forêts à proximité des villes, la question de son influence à long terme reste posée. De ce fait, le recul de la diversité des champignons comestibles pourrait être du à une dégénérescence progressive des mycélia. Cette possibilité soulève des questions quant aux mesures à prendre pour protéger des espèces dont la régression a été constatée.

En Suisse, de nombreux cantons ont introduit des mesures limitant la cueillette des champignons comestibles. Les mesures prises sont de trois types : quantitatives (limite du poids de la cueillette), temporelles (interdiction de ramassage pendant la première semaine de chaque mois, dans les canton de Berne et de Fribourg, par exemple) ou géographiques (interdiction du ramassage dans certaines réserves

naturelles). De telles restrictions des ne sont pas aisément acceptées par la population concernée, et ne sont pas basées sur des évidences expérimentales.

Notre étude permet d'affirmer que les spores ne jouent qu'un rôle restreint chez les deux espèces de *Xerocomus* étudiées. En trois ans, aucun nouveau génet n'est apparu, et aucun renouvellement génétique n'a été mis en évidence dans les mycélia existants. Chez les espèces formant de grands génets durables, comme *Suillus variegatus, S. bovinus, Cortinarius rotundisporus*, *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus*, la cueillette n'aurait pas plus d'influence que la récolte des fruits n'en a sur l'arbre qui les porte. La reproduction sexuée est un événement rare, qu'une faible réserve de spores pourrait assurer. Toutefois, l'extrapolation des ces résultats à une échelle spatio-temporelle plus vaste ne peut se faire qu'avec prudence.

En ce qui concerne *Laccaria amethystina*, les spores jouent un rôle essentiel, une nouvelle génération apparaissant chaque année. Dans ce cas, la cueillette pourrait être néfaste. Cependant, étant donné le grand nombre de sporophores produits, leur petite taille et leur durée de vie courte, il est peu probable qu'un ramassage même intensif puisse réduire la réserve de spores dans l'environnement jusqu'à empêcher le renouvellement de l'espèce.

Ces résultats préliminaires, limités dans le temps et dans l'espace, ne peuvent en aucun cas conduire à un dénigrement des efforts entrepris en vue de protéger les champignons. Ils suggèrent toutefois un recentrage de la politique de protection sur une préservation des milieux hébergeant des espèces rares ou à grande diversité fongique, plutôt que sur les sporophores eux-mêmes.

9 CONCLUSION

Les champignons sont parmi les organismes les plus insaisissables dans leur morphologie, cycle de vie et écologie. L'objectif de cette thèse était d'étudier la structuration génétique spatio-temporelle de trois espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens, dans le but de déterminer l'importance relative de la reproduction sexuée et de la propagation végétative. La définition de la structure génétique des populations fongiques est logiquement le premier pas dans la génétique des populations, puisque la structure génétique d'une population reflète son histoire aussi bien que son potentiel évolutif (MCDONALD 1997).

Dans la forêt de La Chanéaz, l'analyse moléculaire de la variation génétique a révélé deux stratégies distinctes de colonisation et de maintien des populations de champignons ectomycorhiziens, dans deux parcelles proches.

Les populations de *Xerocomus chrysenteron* et *X. pruinatus* sont représentées, dans la parcelle 47 de la réserve mycologique de La Chanéaz, par un seul génet étendu par espèce. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'établissement de nouveaux génets en trois ans, et d'après la taille des génets présents, cet événement semble très rare. Les génets en place semblent exclure l'implantation de nouveaux génets de la même espèce, tout en cohabitant avec d'autres espèces de champignons ectomycorhiziens. Ces deux espèces, mais *Xerocomus chrysenteron* en particulier, privilégient la propagation végétative, par croissance mycélienne, tout en produisant un nombre conséquent de sporophores, donc de spores sexuées.

Les populations de *Laccaria amethystina* sont quant à elles représentées par de multiples petits génets, durant une saison ou moins en général, et ne produisant la plupart du temps qu'un seul sporophore. Ce type de structure, identique à celui qui avait été observé dans les Vosges par GHERBI *et al.* (1999), s'est maintenu pendant trois ans ; il ne s'agirait donc pas d'un état transitoire pouvant évoluer vers la formation de génets stables.

Comment intégrer ces données au corpus de connaissances déjà acquises ? Les résultats obtenus pour *Laccaria amethystina* confirment l'adoption par cette espèce d'une seule stratégie, dans deux environnements différents - la hêtraie des Vosges et la forêt mixte de La Chanéaz. Elle ne semble pas posséder la possibilité de s'établir durablement, et nous formulons l'hypothèse qu'elle ne possède pas les capacités qui lui permettraient d'établir un mycélium étendu, ne possédant que des hyphes peu différenciées et pas de rhizomorphes. Le recours fréquent à la reproduction sexuée serait donc une conséquence de la forte mortalité des génets, liée à leur petite taille.

Xerocomus chrysenteron et *X. pruinatus* confirment les résultats obtenus pour deux espèces du genre *Suillus*, appartenant à la famille des Bolétacées, soit l'aptitude de ces espèces à former des génets très étendus, ne se chevauchant pas, persistant de longues années. La reproduction sexuée est de ce fait un événement rare. La propagation végétative est assurée par une forte différenciation du mycélium en rhizomorphes permettant la translocation rapide et bidirectionnelle de nutriments.

> Les conclusions de notre étude tendraient à supposer que les caractéristiques morphologiques du mycélium seraient un des facteurs essentiels déterminant la structuration des populations ectomycorhiziennes. Les espèces formant des rhizomorphes de type différencié seraient capables de s'étendre et de persister pendant la mauvaise saison, sous forme de rhizomorphes. Les espèces au mycélia extraracinaire non différencié auraient une croissance limitée, aussi bien dans le temps que dans l'espace.

Nous adhérons à l'avis de (DAHLBERG & STENLID 1995), que nous aimerions citer : "Nous prédisons que les relevés futurs de structures de populations ectomycorhiziennes vont révéler une relation forte entre les caractéristiques spatiales et l'autoécologie d'une espèce donnée". De même, BRUNS (1995) avance qu'un des obstacles majeurs pour comprendre la diversité des communautés ectomycorhiziennes est le manque d'information sur l'histoire de vie des taxa. HORTON & BRUNS (2001), qui qualifient les structures des communautés ectomycorhiziennes de "boîte noire", et regrettent que la distribution et l'abondance des mycélia dans le sol soient encore si peu documentées in situ.

Les perspectives d'avenir pourraient être élargies si une attention particulière était accordée à ces questions dans des études futures. En effet, nous constatons que la référence à des modèles comme celui établissant le rôle de l'âge de la forêt et des stratégies reproductives des espèces sur la structuration des populations ectomycorhiziennes ne conduit pas à des pistes explicatives satisfaisantes, et limite la portée des réponses obtenues.

Les limites de notre travail, les contraintes de temps, ne nous ont pas permis de répondre à toutes les questions qui se sont posées au fur et à mesure de l'obtention des résultats. Ses prolongements les plus souhaitables consisteraient à :

1) décrire la distribution spatio-temporelle d'autres espèces différant par le type de rhizomorphes produits, afin d'établir une éventuelle corrélation entre la présence des rhizomorphes et la taille des génets. Il serait intéressant de choisir d'autres Bolétacées, comme les genres *Boletus*, *Boletinus*, *Leccinum*, qui forment les rhizomorphes de type F décrit par AGERER (1991) (Figure 5), et, dans le même milieu, des espèces qui n'en produisent pas, comme *Cortinarius obtusus*, *Dermocybe cinnamomea* et *Tricholoma sulfureum.* Dans le genre *Cortinarius* en particulier, plusieurs types de rhizomorphes ont été décrits, des plus simples (sous-genre *Dermocybe*) aux plus complexes (*Cortinarius rotundisporus*) (AGERER 1987-1998), ce qui permettrait de tester la corrélation à l'intérieur d'un seul taxon. Ces observations devraient être répétées dans des milieux différents.

2) s'interroger sur les causes de mortalité des petits génets de *Laccaria amethystina* ou d'autres espèces présentant les mêmes caractéristiques, en tentant de mettre en évidence des perturbations dans le sol, la profondeur des racines mycorhizées, la diversité génétique des arbres, la concurrence interspécifique.

3) tenter de répondre aux intrigantes questions soulevées par l'observation de structures de populations différentes en fonction de l'habitat chez *Hebeloma cylindrosporum* (GUIDOT 2000). De nouvelles espèces présentant cette

particularité pourraient être recherchées par un échantillonnage rapide dans des milieux contrastés. Des informations essentielles sont aussi obtenues lors des études le long de transects définissant des changements progressifs de milieu (TAYLOR *et al.* 2000, VAN DER HEIJDEN 2000). Dans ce cas, une attention particulière devrait être accordée aux caractéristiques de la rhizosphère. Les types de sol, l'épaisseur et la qualité de la litière, la disponibilité en nutriments, la teneur en eau, la microfaune, l'architecture racinaire des arbres mycorhizés, voire leur variabilité génétique sont toutes des variables dont l'impact probable mériterait une évaluation.

4) étudier, par des méthodes expérimentales appropriées, le rôle des caractéristiques physiologiques, selon leur variabilité interspécifique et intraspécifique. L'utilisation des composés carbonés de la litière, l'efficacité dans le prélèvement du carbone de la plante hôte sont des caractéristiques qui ont été invoquées pour justifier le succès compétitif de certaines espèces ectomycorhiziennes ou certaines souches par rapport à d'autres. La relation entre l'investissement mycélien et la dominance au niveau des racines pourrait être éclaircie.

Pour les points 1) à 3), l'échantillonnage des sporophores et leur typage moléculaire par des marqueurs multiloci pourrait constituer une première étape, en vue d'établir une grille de prélèvements souterrains adaptée. En effet, si on considère l'effort important exigé par le prélèvement des mycorhizes, les perturbations entraînées dans le site par un échantillonnage suffisamment fin et fréquent, l'avantage d'une connaissance préalable du site et de la structuration des populations qui l'habitent semble appréciable. Il est clair que l'exploration des structures souterraines est à même de répondre de manière plus précise aux questions que l'on se pose, notamment au niveau de la longévité des petits génets.

Nous espérons avoir ainsi contribué à poser des jalons en vue de la résolution des ces questions d'actualité en donnant un instantané de la grandeur physique des génets de trois Basidiomycètes ectomycorhiziens, de leur persistance dans le temps, et de leur structuration génétique. Cela a permis d'élucider l'importance relative de la reproduction sexuée versus la croissance végétative. L'histoire de vie des ces espèces a été inférée à partir des connaissances acquises sur la propagation, la fréquence de l'établissement de la symbiose, la durabilité et la mortalité des génets constitués.

10 LEXIQUE

- **Clone** : descendance d'un individu par multiplication végétative ; individu de cette descendance. Chez les champignons ectomycorhiziens, des clones sont des génets * spatialement discontinus, d'origine commune.

- **Communauté** : ensemble des espèces considérées dans un espace déterminé. Les critères de choix des espèces dépendent des limites de l'étude ; cela peut être l'ensemble des champignons mycorhiziens ou seulement les ectomycorhiziens, ou la macrofonge, ou les Basidiomycètes mycorhiziens, par exemple.

- **Diversité spécifique** : se calcule par l'index de Shannon-Wiener qui combine richesse et régularité (*evenness*).

- **Espèce** : la notion d'espèce dans le règne des champignon est particulièrement difficile à cerner, en raison de la coexistence de la reproduction asexuée et sexuée (HARRINGTON & RIZZO 1999). La plupart des espèces ont été décrites sur des critères morphologiques et ultrastructuraux, malgré les difficultés liées à la morphologie souvent convergente (BRUNS *et al.* 1991). Le concept biologique d'espèce a été appliqué sur la base de test d'interfertilité (HARRINGTON & RIZZO 1999). Le concept phylogénétique d'espèce connaît des applications croissantes, grâce à l'émergence des méthodes moléculaires, permettant aussi d'inférer l'évolution (BRUNS *et al.* 1991, VILGALYS *et al.* 1991), ou de montrer les relations phylogénétiques dans un important taxon, l'ordre des Agaricales (MONCALVO *et al.* 2000).

- **Génet** : terme utilisé par les généticiens, notamment en mycologie, pour désigner un "individu" fongique. Des sporophores ou des portions de mycélia montrant des profils identiques pour des marqueurs moléculaires multiples sont considérés comme appartenant au même génet. Seuls les marqueurs moléculaires multiloci permettent de reconnaître les génets.

- **Génome** : patrimoine génétique d'un organisme.

- **Génotype** : type génétique global, basé sur l'ensemble du génome. Nous avons préféré éviter ce terme dans notre étude, car les marqueurs utilisés ne portaient que sur un nombre restreint de sites, suffisant pour définir des génets, mais non des génotypes complets.

- **Haplotype** : gène ou locus reconnu par un marqueur génétique unique. Les individus partageant un même haplotype ne sont pas forcément identiques.

- **Hyménomycètes** : groupe de Basidiomycètes regroupant deux ordres hétérogènes, les Agaricales et les Aphyllophorales. La caractéristique commune est d'avoir des basides unicellulaires regroupées dans un hyménium externe, et des spores s'éjectant directement dans l'environnement. Ils représentent un peu plus de 40 % des espèces de Basidiomycètes (CLÉMENÇON 1997).

S.C.D. - [illegible]
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LÈS-NANCY

- **Mycobionte** : le partenaire fongique de la symbiose mycorhizienne.

- **Population** : les espèces sont structurées en populations, plus ou moins génétiquement différenciées. Dans les populations de champignons, les individus ne sont pas directement identifiables, car ils ne forment pas des entités spatiales discrètes. Une définition de la population de champignons pragmatique et adaptée à des études sur le terrain a été proposée par ANDERSON & KOHN (1998) : "un groupe d'individus de la même espèce croissant dans la même localité au même moment". Toujours dans la même perspective et selon les même auteurs, l'unité de base de ces populations est le génet, qui doit être identifié de manière sûre par des marqueurs multiloci, définissant des génotypes uniques (dont les chances d'être retrouvés par hasard sont quasiment nulles).

- **Ramet** : la croissance du mycélium peut entraîner sa fragmentation. Un génet peut de ce fait être composé de ramets spatialement distincts. L'existence de ramets est difficile à prouver in situ, on ne peut que rarement exclure la présence de toute connexion.

- **Richesse spécifique** (abrégé par richesse) : nombre d'espèces par unité de surface.

- **Sporophore** : littéralement, "porteur de spores", la fructification du champignon, en général éphémère. Peut prendre des formes extrêmement variées, pour les espèces dont il est question ici il s'agit de la plus classique, avec un pied et un chapeau. Synonymes : fructification, carpophore ou sporocarpe, basidiome, basiodiophore ou basidiocarpe (s'il s'agit d'un Basidiomycète) et, abusivement, puisque l'on exclut ainsi le reste du mycélium, champignon.

- **Succession** : changement directionnel dans la composition, l'abondance relative et la distribution spatiale des espèces comprenant les communautés (FRANKLAND 1998).

- **Symbionte** : chaque partenaire d'une symbiose.

11 BIBLIOGRAPHIE

AANEN D, KUYPER T & HOEKSTRA R (2001) "A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma velutipes*" *Mycological Research, **105**: 284-290.*

ABUZINADAH R & READ DJ (1986) "The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. III. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi" *New Phytologist, **103**: 481-493.*

ADAMS DH, ROTH LF (1969) "Intraspecific competition among genotypes of *Fomes cajanderi* decaying young-growth Douglas-fir" *Forest Science, **15**: 327-331.*

AGERER R (1987-1998) *"Colour atlas of ectomycorrhizae"*. Ed. EINHORN-VERLAG. Schwäbisch Gmünd, D.

AGERER R (1991) "Characterisation of ectomycorrhiza" *Methods in Microbiology, **23**: 25-73.*

AHONEN-JONNARTH U, VAN HEES P, LUNDSTRÖM U & FINLAY R (2000) "Organics acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations" *New Phytologist, **146**: 557-567.*

ALLEN EB, ALLEN MF, HELM DJ, TRAPPE JM, MOLINA R & RINCON E (1995) "Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity" *Plant and Soil, **170**: 47-62.*

ANDERSON I, CHAMBERS S & CAIRNEY JW (2001) "Distribution and persistence of Australian *Pisolithus* species genets at native sclerophyll forest field sites" *Mycological Research, **105** (8): 971-976.*

ANDERSON J & KOHN L (1998) "Genotyping, gene genealogies and genomics bring fungal population genetics above ground" *Trends in Ecology and Evolution, **13**: 444-449.*

ANDERSSON S & SÖDERSTRÖM B (1995) "Effects of lime $CaCO_3$ on ectomycorrhizal colonization of *Picea abies* (L.) Karst. seedlings planted in a spruce forest" *Scandinavian Journal of Forest Research, **10**: 149-154.*

ANGWIN P & HANSEN EM (1993) "Pairing tests to determine mating compatibility in *Phellinus weirii*" *Mycological Research, **97**: 1469-1475.*

ARNOLDS E (1991) "Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe" *Agriculture, Ecosystems and Environment, **35**: 209-244.*

ARNOLDS E (1995) "Conservation and management of natural populations of edible fungi" *Canadian Journal of Botany, **73** (Suppl. 1): 987-998.*

ARNOLDS E (1997) "A quantitative approach to the Red List of larger fungi in the Netherlands" *Mycologia Helvetica, **9** (2): 47-59.*

BAAR J & KUYPER T (1993) "*Litter removal in forests and effect on mycorrhizal fungi*" *In* Fungi of Europe: investigation, recording and mapping. Ed. PEGLER D, BODDY L, ING B & KIRK P. Kew Gardens, London. Pp. 275-286.

S.C.D. - U.H.P. - NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

BAAR J, OZINGA W & KUYPER T (1994) "Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps after removal of litter and humus layer in a *Pinus sylvestris* forest" *Mycological Research, **98** (7): 726-728.*

BAAR J, HORTON T, KRETZER A & BRUNS TD (1999) "Mycorrhizal colonization of *Pinus muricata* from resistant propagules after a stand-replacing wildfire" *New Phytologist, **143**: 409-418.*

BAXTER JW, PICKETT ST, CARREIRO MM & DIGHTON J (1998) "Ectomycorrhizal diversity and community structure in oak forest stands exposed to contrasting anthropogenic impacts" *Canadian Journal of Botany, 77: 771-782.*

BÉGUIRISTAIN T & LAPEYRIE F (1997) "Host plant stimulates hypaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hypaphorine controls root hair development" *New Phytologist, **136**: 525-532.*

BELL R, EVANS C & ROBERTS E (1988) "Decreased incidence of mycorrhizal root tips associated with heavy-metal enrichment" *Plant and Soil, **106**: 143-145.*

BIANCIOTTO V, LUMINI E, LANFRANCO L, MINERDI D, BONFANTE P & PEROTTO S (2000) "Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae" *Applied and Environmental Microbiology, **66** (10): 4503-4509.*

BIDARTONDO M, KRETZER A & BRUNS TD (2000) "High root concentration and uneven ectomycorrhizal diversity near *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae): a cheater that simulates its victims ?" *American Journal of Botany, 87: 1783-1788.*

BINDER M & FISCHER M (1997) "Molekularbiologische Charakterisierung der Gattungen *Boletellus* und *Xerocomus: Xerocomus pruinatus* und verwandte Arten" *Bollettino del Gruppo Micologico G. Bresadola, **40** (2-3): 79-90.*

BONELLO P, BRUNS TD & GARDES M (1998) "Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*" *New Phytologist, **138**: 533-542.*

BOUJON C (1997) "Diminution des champignons mycorhiziques dans une forêt suisse: une étude rétrospective de 1925 à 1994" *Mycologia Helvetica **9** (2):117-132.*

BOYCE J (1961) *"Forest pathology"*. Ed. MCGRAW-HILL. New York. Pp.

BRADLEY R, BURT A & READ DJ (1981) "Mycorrhizal infection and resistance to heavy metal toxicity in *Calluna vulgaris*" *Nature, **292**: 335.*

BRAND F & AGERER R (1986) "Studien an Ectomycorrhizen VIII. Die Mycorrhizen von *Lactarius subdulcis*, *L. vellereus* und *Laccaria amethystina* an Buche" *Zeischrift für Mykologie, **52** (2): 287-320.*

BRAND F (1989) "Studies on ectomycorrhizae XXI. Beech ectomycorrhizae and rhizomorphs of *Xerocomus chrysenteron* (Boletales)" *Nova Hedwigia, **48**: 469-483.*

BREITENBACH J & KRÄNZLIN F (1984-2000) *"Champignons de Suisse"*. Ed. Lucerne, CH.

BRUNS TD, WHITE TJ & TAYLOR JW (1991) "Fungal molecular systematics" *Annu. Rev. Ecol. Syst., **22**: 525-564.*

BRUNS TD (1995) "Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi" *Plant and Soil, **170**: 63-73.*

BURGESS T, LAURENT P, DELL B, MALJCZUK N & MARTIN F (1995) "Effect of fungal-isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhizas" *Planta, **195**: 408-417.*

BUSCOT F (1994) "Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karsten" *Mycorrhiza, **4**: 223-232.*

BYRD KB, PARKER TV, VOGLER DR & CULLINGS KW (2000) "The influence of clear-cutting on ectomycorrhizal fungus diversity in a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand, Yellowstone National Park, Wyoming, and Gallatin National Forest, Montana" *Canadian Journal of Botany, **78**: 149-156.*

CAIRNEY JW & BURKE R (1996) "Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis" *New Phytologist, **134**: 685-695.*

CAIRNEY JWG (1992) "Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs" *Mycological Research, **96** (2): 135-141.*

CAIRNEY JWG (1999) "Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi" *Mycorrhiza **9**: 123-135.*

CAMPBELL N, HARRISS F, ELPHINSTONE M & BAVERSTOCK P (1995) "Outgroup heteroduplex analysis using temperature gradient gel electrophoresis: high resolution, large scale, screening of DNA variation in the mitochondrial control region" *Molecular Ecology, **4**: 407-418.*

CASGRAIN P & LEGENDRE P (2001) "The R package for multivariate and spatial analysis, version 4.0d3 - User's manual, Département des sciences biologiques, Université de Montréal,

CATEN C (1980) "*Parasexual processes in fungi" In* The fungal nucleus. Ed. GULL K & OLIVER S. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 190-214.

CHAPPELKA A, KUSH J, RUNION G, MEIER S & KELLY W (1991) "Effects of soil-applied lead on seedling growth and ectomycorrhizal colonization of loblolly pine" *Environnemental Pollution, 72: 397-316.*

CHILVERS G, LAPEYRIE F & HORAN D (1987) "Ectomycorrhizal *vs* endomycorrhizal fungi within the same root system" *New Phytologist, **107**: 441-448.*

CLÉMENÇON H (1984) "Kompendium der Blätterpilze. VI. *Laccaria*" *Zeischrift für Mykologie, **50** (1): 3-12.*

CLÉMENÇON H (1997) *"Anatomie der Hymenomyceten"*. Ed. LAUSANNE UD. Lausanne, CH. Pp. 1-996.

COETZEE MP, WINGFIELD BD, HARRINGTON TC, STEIMEL J, COUTINHO TA & WINGFIELD MJ (2001) "The root rot fungus *Armillaria mellea* introduced into South Africa by early Dutch settlers" *Molecular Ecology, **10**: 387-396.*

CONN C & DIGHTON J (2000) "Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity" *Soil Biology and Biochemistry, **32**: 489-496.*

COOKE R & RAYNER A (1984) *"Ecology of saprotrophic fungi"*. Ed. LONGMAN. London. Pp.

COURTECUISSE R (1991) *"Present state of the inventorying, mapping and red-data list programs concerning French mycota" In* Conservation of Fungi in Europe. Ed. ARNOLDS E, KREISEL H. Universität Greifswald, Greifswald, D. Pp. 14.

COUTTS M & NICHOLL B (1990a) "Waterlogging tolerance of roots of Sitka spruce clones and of strands from *Telephora terrestris* mycorrhiza" *Canadian Journal of Forest Research, **20**: 1896-1899.*

COUTTS M & NICHOLL B (1990b) "Growth and survival of shoots, roots and mycorrhizal mycelium in clonal Sitka spruce during the first growing season after planting" *Canadian Journal of Forest Research, **20**: 861-868.*

CROMACK KJ, FICHTER B, MOLDENKE A, ENTRY J & INGHAM E (1988) "Interactions between soil animals and ectomycorrhizal fungal mats" *Agriculture, Ecosystems and Environment, **24**: 161-168.*

DAHLBERG A (1997) "Population ecology of *Suillus variegatus* in old Swedish Scots pine forests" *Mycological Research, **101** (1): 47-54.*

DAHLBERG A (2001) "Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field" *New Phytologist, **150**: 555-562.*

DAHLBERG A & STENLID J (1990) "Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones" *New Phytologist, **115**: 487-493.*

DAHLBERG A & STENLID J (1994) "Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L:Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility" *New Phytologist, **128**: 225-234.*

DAHLBERG A & STENLID J (1995) "Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations" *Canadian Journal of Botany, **73**: S1222-S1230.*

DAHLBERG A, JONSSON L & NYLUND J-E (1997) "Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden" *Canadian Journal of Botany, **75**: 1323-1335.*

DANIELSON R & PRUDEN M (1989) "The ectomycorrhizal status of urban spruce" *Mycologia, **81**: 335-341.*

DE LA BASTIDE PY, KROPP B & PICHÉ Y (1994) "Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Marie) Orton" *New Phytologist, **127**: 547-556.*

DEACON J, DONALDSON S & LAST F (1983) "Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch" *Plant and Soil, 71: 257-262.*

DEACON J & FLEMING L (1992) "*Interactions of ectomycorrhizal fungi" In* Mycorrhizal functioning - an integrated plant-fungal process. Ed. MF A. Chapman and Hall, New York. Pp. 134-160.

DEBAUD J, MARMEISSE R & GAY G (1995) "*Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi" In* Mycorrhiza: structure, molecular biology and function. Ed. VARMA A & HOCK B. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 79-113.

DI BATTISTA C, SELOSSE M-A, BOUCHARD D, STENSTRÖM E & LE TACON F (1996) "Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S238" *Mycological Research, **100**: 1315-1324.*

DIGHTON J & MASON P (1985) "Mycorrhizal dynamics during forest tree development" *In* Developmental biology of higher fungi. Ed. Moore D, Casselton LA, Wood DA & Frankland JC. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

DIGHTON J, POSKITT J & HOWARD D (1986) "Changes in occurrence of basidiomycete fruit bodies during forest stand development: with specific reference to mycorrhizal species" *Transactions of the British Mycological Society, **87** (1): 163-171.*

DIGHTON J (1991) "Acquisition of nutrients from organic resources by mycorrhizal autotrophic plants" *Experientia, **47**: 362-369.*

DITENGOU FA & LAPEYRIE F (2000) "Hypaphorine from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* counteracts activities of indole-3-acetic acid and ethylene but not synthetic auxins in eucalypt seedlings" *Molecular Plant-Microbe Interactions, **13** (2): 151-158.*

DOWNES G, ALEXANDER I & CARNEY J (1992) "A study of spruce (*Picea stichensis*) ectomycorrhizas" *New Phytologist, **122**: 141-152.*

DOWSON C, RAYNER A & BODDY L (1989) "Spatial dynamics and interactions of the woodland fairy ring fungus, *Clitocybe nebularis*" *New Phytologist, **111**: 699-705.*

DREISBACH TA (1997) "The *Phellinus pini* complex: genetic and populations studies within and between species" PhD Thesis, Oregon State University. Oregon, USA. Pp. 157.

EGGER K (1994) "Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities" *Canadian Journal of Botany, 73 (Suppl. 1): 1415-1422.*

EGLI S, AYER F & CHÂTELAIN F (1990) "Der Einfluss des Pilzsammelns auf die Pilzflora" *Mycologia Helvetica, 3: 417-428.*

EGLI S, AYER F & CHÂTELAIN F (1997) "The description of diversity of macromycetes. Results of fungal ecological longterm studies in mycological reserve of La Chanéaz, FR, Switzerland" *Mycologia Helvetica, **9** (2): 19-32.*

EISFELDER I (1970) "*Pilztiere (Tiere an und in Pilzen)" In* Handbuch für Pilzfreunde, Band V. Ed. MICHAEL-HENNIG. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. Pp. 54-151.

S.C.D. - I.N.P.L.
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

ERLAND S & TAYLOR A (1999) "*Resupinate ectomycorrhizal genera" In* Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile. Ed. CAIRNEY JW & CHAMBERS S. Springer-Verlag, Heidelberg, D. Pp. 347-363.

ETHERIDGE D & CRAIG H (1976) "Factors influencing infection and initiation of decay by the Indian paint fungus (*Echinodontium tinctorium*) in western hemlock" *Canadian Journal of Forest Research, 6: 299-318.*

FINLAY R & READ DJ (1986) "The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of ^{14}C- labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium" *New Phytologist, **103**: 143-156.*

FINLAY R (1989) "Functional aspects of phosphorus uptake and carbon translocation in incompatible ectomycorrhizal associations between *Pinus sylvestris* and *Suillus grevillei* and *Boletinus cavipes*" *New Phytologist, **112**: 185-192.*

FIORE-DONNO A-M & MARTIN F (2001) "Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina, Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest" *New Phytologist, **152**:533-542.*

FLEMING L (1983) "Succession of mycorrhizal fungi on birch: infection of seedlings planted around mature trees" *Plant and Soil, 71: 263-267.*

FOX F (1983) "Role of basiodiospores as inocula of mycorrhizal fungi of birch" *Plant and Soil, 71: 269-273.*

FRANK A (1885) "Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unteridische Pilze" *Ber. Dtsch. Bot. Ges, 3: 128-145.*

FRANKLAND J, POSKITT J & HOWARD D (1995) "Spatial development of populations of a decomposer fungus, *Mycena galopus*" *Canadian Journal of Botany, 73: S1399-S1406.*

FRANKLAND JC (1998) "Fungal succession - unravelling the unpredictable" *Mycological Research, **102** (1): 1-15.*

FREY P, FREY-KLETT P, GARBAYE J, BERGE O & HEULIN T (1997) "Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-*Laccaria bicolor* mycorrhizosphere" *Applied and Environmental Microbiology, **63** (5): 1852-1860.*

FRIES N & MUELLER G (1984) "Incompatibility systems, cultural features and special circumscriptions in the ectomycorrhizal genus *Laccaria* (Agaricales)" *Mycologia, 76: 633-642.*

FRIES N & NEUMANN W (1990) "Sexual incompatibility in *Suillus luteus* and *S. granulatus" Mycological Research, **94**: 64-70.*

FRIES N & SUN P (1992) "The mating system of *Suillus bovinus" Mycological Research, **96**: 237-238.*

GANDEBOEUF D, DUPRÉ C, ROECKEL-DREVET P, NICOLAS P & CHEVALIER G (1997) "Typing *Tuber* ectomycorrhizae by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers" *Canadian Journal of Microbiology, **43**: 723-728.*

GANGE A (2000) "Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth" *Trends in Ecology and Evolution, **15**: 369-372.*

GARBAYE J (1991) "*Utilisation des mycorhizes en sylviculture" In* Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Ed. STRULLU D. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris. Pp. 205-227.

GARBAYE J (1994) "Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis" *New Phytologist, **128**: 197-210.*

GARDES M & BRUNS TD (1991) "Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS" *Mycological Society Newsletter, **41**: 14.*

GARDES M & BRUNS TD (1993) "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts" *Molecular Ecology, **2**: 113-118.*

GARDES M & BRUNS TD (1996) "Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground view" *Canadian Journal of Botany, **74**: 1572-1583.*

GAY G & DEBAUD J (1987) "Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species: inter- and intraspecific variability in homo- and dikaryotic mycelia" *Applied Microbiology Biotechnology, **26**: 141-146.*

GAY G, NORMAND L, MARMEISSE R, SOTTA B & DEBAUD J (1994) "Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity" *New Phytologist, **128**: 645-657.*

GHERBI H, DELARUELLE C, SELOSSE M-A & MARTIN F (1999) "High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest" *Molecular Ecology, **8**: 2003-2013.*

GIBSON F & DEACON J (1990) "Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorous in relation to successions" *Mycological Research, **94** (2): 166-172.*

GLEN M, TOMMERUP I, BOUGHER N & O'BRIEN P (2001) "Specificity, sensivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in *Eucalyptus* forests and plantations" *Mycological Research, **105** (2): 138-149.*

GRAYSTON S, VAUGHAN D & JONES D (1996) "Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability" *Appl. Soil Ecology, **5**: 29-56.*

GRIFFITHS R & CALDWELL B (1992) "*Mycorrhizal mat communities in forest soils" In* Mycorrhizas in ecosystems. Ed. READ DJ, LEWIS D, FITTER A & ALEXANDER I. CAB International, Wallingford. Pp. 98-105.

GRIME J (1977) "Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory" *American Naturalist, **111**: 1169-1194.*

GRYTA H, DEBAUD J, EFFOSSE A, GAY G & MARMEISSE R (1997) "Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus Hebeloma cylindrosporum in coastal sand dune forest ecosystems" *Molecular Ecology, **6**: 353-364.*

GRYTA H, DEBAUD J & MARMEISSE R (2000) "Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding" *Heredity, **84**: 294-302.*

GUIDOT A, LUMINI E, DEBAUD J & MARMEISSE R (1999) "The nuclear ribosomal DNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on *Pinus* root systems" *Applied and Environmental Microbiology, **65**: 903-909.*

GUIDOT A (2000) "*Populations épigées et souterraines du champignon symbiotique* Hebeloma cylindrosporum *associées au pin maritime : influence de l'habitat*" Thèse de Doctorat, Université Claude-Bernard - Lyon 1, Lyon, France. Pp. 214.

GUIDOT A, DEBAUD J & 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.*

HAMPP R & SCHAEFFER C (1995) "*Mycorrhiza-carbohydrates and energy metabolism" In* Mycorrhiza: structure, molecular biology and function. Ed. VARMA A & HOCK B. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. Pp. 267-296.

HANSEN EM & HAMELIN RC (1999) "*Population strucure of basidiomycetes" In* Structure and dynamics of fungal populations. Ed. WORRAL JJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Pp. 251-281.

HARRINGTON TC & RIZZO DM (1999) "*Defining species in the fungi" In* Structure and dynamics of fungal populations. Ed. WORRAL JJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Pp. 43-71.

HARVEY A, LARSEN M & JURGENSEN M (1979) "Comparative distribution of ectomycorrhizae in soil of three Western Montana forest habitat" *Forest Science, **25** (2): 350-358.*

HAWKSWORTH D, KIRK P, SUTTON B & PEGLER D (1995) *"Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi".* INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE, Surrey, UK. CAB International, Oxon, UK, Pp. 616.

HAWKSWORTH D & ROSSMAN A (1997) "Where are all the undescribed fungi ?" *Phytopathology, **87**: 888-891.*

HENRION B, LE TACON F & MARTIN F (1992) "Rapid indentification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal genes" *New Phytologist, **122**: 289-298.*

HENRION B, CHEVALIER G & MARTIN F (1994a) "Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers" *Mycological Research, **98**: 37-43.*

HENRION B, DI BATTISTA C, BOUCHARD D, VAIRELLES D, THOMPSON B, LE TACON F & MARTIN F (1994b) "Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an

ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the rDNA intergenic spacer" *Molecular Ecology, **3**: 571-580.*

HIBBETT D, GILBERT L & DONOGHUE M (2000) "Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes" *Nature, **407**: 506-508.*

HO I & TRAPPE JM (1987) "Enzymes and growth substances of *Rhizopogon* species in relation to mycorrhizal hosts and infragenetic taxonomy" *Mycologia, **79**: 553-558.*

HÖGBERG P, NORDGREN A, BUCHMANN N, TAYLOR A, EKBLAD A, HÖGBERG MN, NYBERG G, OTTOSSON-LÖFVENIUS M & READ DJ (2001) "Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration" *Nature, **411**: 789-792.*

HOLMER L & STENLID J (1991) "Population structure and mating system in *Marasmius androsaceus*" *New Phytologist, **119**: 307-314.*

HÖNIG K, RIEFLER M & KOTTKE I (2000) "Survey of *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. inoculum and fruitbodies in a nursery by IGS-RFLPs and IGS sequences" *Mycorrhiza, **9**: 315-322.*

HORAN D & CHILVERS G (1990) "Chemotropism - the key to ectomycorrhizal formation ?" *New Phytologist, **116**: 297-301.*

HORTON T & BRUNS TD (2001) "The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology : peeking into the black-box" *Molecular Ecology, **10**: 1855-1871.*

HSEU R, WANG H, WANG H & MONCALVO J-M (1996) "Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences" *Applied and Environmental Microbiology, **62** (4): 1354-1363.*

INGOLD C (1971) *"Fungal spores. Their liberation and dispersal"*. Ed. Clarendon Press. Oxford.

JACOBSON K, MILLER O & TURNER B (1993) "Randomly amplified polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **90**: 9159-9163.*

JAMES TY & VILGALYS R (2001) "Abundance and diversity of *Schizophyllum commune* spore clouds in the Carribean detected by selective sampling" *Molecular Ecology, **10**: 471-479.*

JANSEN A (1991) "The mycorrhizal status of Douglas fir in The Netherlands: its relation with stand age, regional factors, atmospheric pollutants and tree vitality" *Agriculture, Ecosystems and Environment, **35**: 191-208.*

JONGMANS A, VAN BREEMEN N, LUNDSTRÖM U, VAN HEES P, FINLAY R, SRINIVASAN M, UNESTAM T, GIESLER R, MELKERUD P-A & OLSSON M (1997) "Rock-eating fungi" *Nature, **389**:*

JONSSON L, DAHLBERG A, NILSSON M, KÅRÉN O & ZACKRISSON O (1999a) "Continuity of ectomycorrhizal fungi in self-regenerating boreal *Pinus sylvestris* forests

studied by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees" *New Phytologist, **142**: 151-162.*

JONSSON L, DAHLBERG A, NILSSON M, ZACKRISSON O & KÅRÉN O (1999b) "Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire" *Molecular Ecology, **8**: 205-215.*

JONSSON T, KOKALJ S, FINLAY R & ERLAND S (1999c) "Ectomycorrhizal community structure in a limed spruce forest" *Mycological Research, **103** (4): 501-508.*

JUMPPONEN A & TRAPPÉ JM (1998) "Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi" *New Phytologist, **140**: 295-310.*

KAY E & VILGALYS R (1992) "Spatial distribution and genetic relationship among individuals in a natural population of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*" *Mycologia, **84**: 173-182.*

KÕLJALG U, DAHLBERG A, TAYLOR A, LARSSON E, HALLENBERG N, STENLID J, LARSSON K, FRANSSON P, KÅRÉN O & JONSSON L (2000) "Diversity and abundance of resupinate thelephoroid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests" *Molecular Ecology, **9**: 1985-1996.*

KOWALSKI S (1987) "Mycotrophy of trees in converted stands remaining under strong pressure of indusrial pollution" *Zeitschrift Vereins für Angewandte Botanik, **61**: 65-83.*

KRANABETTER J & WYLIE T (1998) "Ectomycorrhizal community structure across forest opening on naturally regenerated western hemlock seedlings" *Canadian Journal of Botany, **76**: 189-196.*

KRETZER A, MOLINA R & SPATAFORA J (2000) "Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*" *Molecular Ecology, **9**: 1190-1191.*

KROPP B & MUELLER G (1999) "*Laccaria" In* Ectomycorrhizal fungi : key genera in profile. Ed. CAIRNEY JW & CHAMBERS S. Springer-Verlag, Berlin, D. Pp. 65-88.

LAMHAMEDI M, FORTIN J, KOPE H & KROPP B (1990) "Genetic variation in ectomycorrhiza formation by *Pisolithus arhizus* on *Pinus pinaster* and *P. banksiana*" *New Phytologist, **115**: 689-697.*

LAST F, MASON P, WILSON J & DEACON J (1983) "Fine roots and sheathing mycorrhizas: their formation, function and dynamics" *Plant and Soil, **79**: 9-21.*

LAST F & FLEMING L (1985) "Factor affecting the occurrence of fruitbodies of fungi forming sheathing (ecto-) mycorrhizas with roots of trees" *Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Science), **94** (2-3): 111-127.*

LAST F, DIGHTON J & MASON P (1987) "Successions of sheathing mycorrhizal fungi" *Trends in Ecology and Evolution, **2**: 157-161.*

LE TACON F, ALVAREZ I, BOUCHARD D, HENRION B, JACKSON R, LUFF S, PARLADE J, PERA J, STENSTRÖM E, VILLENEUVE N & WALKER C (1992) "*Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe" In* Mycorrhizas in ecosystems. Ed. FITTER A & ALEXANDER I. CAB International, Wallingford, Conn., USA. Pp. 119-134.

LEGRAND P, GHAHARI S & GUILLAUMIN J-J (1996) "Occurrence of genets of *Armillaria* spp. in four mountain forests in Central France: the colonization strategy of *Armillaria ostoyae*" *New Phytologist, **133**: 321-332.*

LEYVAL C, TURNAU K & HASELWANDTER K (1997) "Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function : physiological, ecological and applied aspects" *Mycorrhiza, 7 (3): 139-153.*

LINDAHL B, FINLAY R & OLSSON S (2001) "Simultaneous, bidirectional translocation of ^{32}P and ^{33}P between wood blocks connected by mycelial cords of *Hypholoma fasciculare*" *New Phytologist, **150**: 189-194.*

LINDER C, MOORE L & JACKSON R (2000) "A universal molecular method for identifying underground plant parts to species" *Molecular Ecology, **9**: 1549-1559.*

LODGE D (1989) "The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo- and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*" *Plant and Soil, **117**: 255-262.*

LYNCH M & MILLIGAN B (1994) "Analysis of population genetic structure with RAPD markers" *Molecular Ecology, **3**: 91-99.*

MACARTHUR R & WILSON E (1967) *"The theory of island biogeography"*. Ed. Princeton University Press, New Jersey. Pp. 437.

MAH K, TACKABERRY L, EGGER K & MASSICOTTE H (2001) "The impacts of broadcast burning after clear-cutting on the diversity of ectomycorrhizal fungi associated with hybrid spruce seedlings in central British Columbia" *Canadian Journal of Forest Research, **31**: 224-235.*

MAIA L, YANO A & KIMBROUGH J (1996) "Species of Ascomycotina forming ectomycorrhizae" *Mycotaxon, **57**: 371-390.*

MAJDI H, DAMM E & NYLUND J-E (2001) "Longevity of mycorrhizal roots depends on branching order and nutrient availability" *New Phytologist, **150**: 195-202.*

MALIK M & VILGALYS R (1999) *"Somatic incompatibility in fungi" In* Structure and dynamics of fungal populations. Ed. WORRAL JJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Pp. 123-138.

MANTEL N & VALAND R (1970) "A technique of nonparametric multivariate analysis" *Biometrics, **26**: 547-558.*

MARÇAIS B, MARTIN F & DELATOUR C (1998) "Structure of *Collybia fusipes* populations in two infected oak stands" *Mycological Research, **102** (3): 361-367.*

MARMEISSE R, GRYTA H, JARGEAT P, FRAISSINET-TACHET L, GAY G & DEBAUD J (1999) *"Hebeloma" In* Ectomycorrhizal fungi. Ed. Cairney JWG & Chambers SM. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 89-127.

MARTIN F, TOMMERUP I & TAGU D (1994) "Genetics of ectomycorrhizal fungi: progress and prospects" *Plant and Soil, **159**: 159-170.*

MARTIN F, LAPEYRIE F & TAGU D (1997) *"Altered gene expression during ectomycorrhizal development" In* The Mycota. Ed. CARROLL G & TUDZYNSKI P. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 223-242.

MARTIN F, COSTA G, DELARUELLE C & DIEZ J (1998) "*Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR" In* Mycorrhiza Manual. Ed. VARMA A & HOCK B. Spinger-Verlag, Berlin. Pp. 463-474.

MARTIN F & TAGU D (1999) "*Developmental biology of a plant-fungus symbiosis : the ectomycorrhiza" In* Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology. Ed. VARMA A & HOCK B. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 51-73.

MARTIN F, PEROTTO S & BONFANTE P (2000) "*Mycorrhizal fungi: a fungal community at the interface between soil and roots" In* The Rhizosphere - biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Ed. PINTON R, VARANINI Z & NANNIPIERI P. Marcel Dekker, Inc., New York - Basel. Pp. 263-296.

MARTIN F (2001) "Frontiers in molecular mycorrhizal research - genes, loci, dots and spins" *New Phytologist, **150**: 499-507.*

MASON P, LAST F, PELHAM J & INGELBY K (1982) "Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*)" *Forest Ecology and Management, **4**: 19-39.*

MASSICOTTE H, PETERSON R & MELVILLE L (1989) "Ontogeny of *Alnus diplophloeus* ectomycorrhizae. I. Light microscopy and scanning electron microscopy" *Canadian Journal of Botany, **67**: 191-200.*

MCAFEE B & FORTIN J (1986) "Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions" *Canadian Journal of Botany, **64**: 848-852.*

McCREIGHT J & SCHROEDER D (1982) "Inhibition of growth of nine ectomycorrhizal fungi by cadmium, lead, and nickel in vitro" *Environmental and Experimental Botany, **22**:1-7.*

MCDONALD BA (1997) "The population genetics of fungi: tools and techniques" *Phytopathology, **87** (4): 448-453.*

MCKENDRICK S, LEAKE J, TAYLOR D & READ DJ (2000) "Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections." *New Phytologist, **145**: 539-548.*

MEHMANN B, EGLI S, BRAUS G & BRUNNER I (1995) "*Coincidence between molecularly or morphologically classified ectomycorrhizal morphotypes and fruitbodies in a spruce forest" In* Biotechnology of Ectomycorrhizae. Molecular approaches. Ed. STOCCHI V, BONFANTE P & NUTI M. Plenum Press, New York. Pp. 41-52.

MEUNIER J-R & GRIMONT P (1993) "Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting" *Res. Microbiol., **144**: 373-379.*

MEYER W, MITCHELL T, FREEDMAN E & VILGALYS R (1993) "Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*" *J. Clin. Microbiol., **31**: 2274-2280.*

MJESTRIK V & LEPSOVA A (1991) "*Applicability of fungi to the monitoring of environmental pollution by heavy metals" In* Plants as biomonitors. Indicators of heavy metals in the terrestrial environment. Ed. MARKERT B. VCH, Weinheim, D. Pp. 365-378.

MOLINA R, MASSICOTTE H & TRAPPE JM (1992) "*Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications" In* Mycorrhizal Functioning. Ed. ALLEN M. Chapman and Hall, New York. Pp. 357-423.

MONCALVO J-M, LUTZONI F, REHNER SA, JOHNSON J & VILGALYS R (2000) "Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences" *Systematic Biology, **49**: 278-305.*

MUELLER G (1992) "Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with discussions on extraliminal taxa and descriptions of extant types" *Botany, **30**: 1-157.*

MUELLER G, HOFSTEN A & AXÉN A (1993) "Basidiospore wall ultrastructure of the false-truffle *Hydnangium* and its phylogenetic significance" *Mycologia, **85**: 890-893.*

NEI M (1972) "Genetic distances between populations" *American Naturalist, **106**: 283-292.*

NEWSHAM K, FITTER A & WATKINSON A (1995) "Multi-funcionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas" *Trends in Ecology and Evolution, **10**: 407-411.*

NEWTON A (1992) "Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi" *Mycorrhiza, **2**: 75-79.*

NYLUND J-E, KASIMIR A & STRANDBERG-ARVEBY A (1982) "Cell wall penetration and papilla formation in senescent cortical cells during ectomycorrhiza synthesis *in vitro*" *Physiological Plant Pathology, **21**: 71-73.*

NYLUND J-E (1988) "The regulation of mycorrhiza formation - carbohydrate and hormone theories reviewed" *Scandinavian Journal of Forest Research, **3**: 465-479.*

OGAWA M (1985) "Ecological characters of ectomycorrhizal fungi and their mycorrhizae - an introduction to the ecology of higher fungi" *Japanese Annual Research Quarterly, **18** (4): 305-314.*

OLSSON P, CHALOT M, BÅÅTH E, FINLAY R & SÖDERSTRÖM B (1996) "Ectomycorrhizal mycelia reduce bacterial activity in a sandy soil" *FEMS Microbiology Ecology, **21**: 77-86.*

OLSSON P, MÜNZENBERGER B, MAHMOOD S & ERLAND S (2000) "Molecular and anatomical evidence for a three-way association between *Pinus sylvestris* and the ectomycorrhizal fungi *Suillus bovinus* and *Gomphidius roseus*" *Mycological Research, **104** (11): 1372-1378.*

ORITA M, IWAHANA H, KANAZAWA H, HAYASHI K & SEKIYA T (1989) "Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, **86**: 2766-2770.*

OSWALD E & FERCHAU H (1968) "Bacterial associations of coniferous mycorrhizae" *Plant and Soil, **28**: 187-192.*

PARIS F, BONNAUD P, RANGER J, ROBERT M & LAPEYRIE F (1995) "Weathering of ammonium- or calcium-saturated 2:1 phyllosilicates by ectomycorrhizal fungi in vitro" *Soil Biology and Biochemistry, **27**: 1237-1244.*

S.C.D. - Mycologie 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

PARIS F, BOTTON B & LAPEYRIE F (1996) "In vitro weathering of phlogopite by ectomycorrhizal fungi" *Plant and Soil, **179**: 141-150.*

PAZMANY D (1993) "Systématique du genre *Laccaria* Berk. & Br." *Zeischrift für Mykologie, **80**: 5-46.*

PEABODY R, PEABODY D & SICARD K (2000) "A genetic mosaic in the fruiting stage of *Armillaria gallica*" *Fungal Genetics and Biology, **29**: 72-80.*

PENNER GA, BUSH A, WISE R, KIM W, DOMIER L, KASHA K, LAROCHE A, SCOLES G, MOLNAR SJ & FEDAK G (1993) "Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories" *PCR methods and applications, **2**: 341-345.*

PEREZ-MORENO J & READ DJ (2000) "Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants" *New Phytologist, **145**: 301-309.*

PEROTTO S, ACTIS-PERINO E, PERUGINI J & BONFANTE P (1996) "Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots" *Molecular Ecology, **5**: 123-131.*

PERRY D, MARGOLIS H, CHOQUETTE C, MOLINA R & TRAPPE JM (1989) "Ectomycorrhizal mediation of competition between coniferous tree species" *New Phytologist, **112**: 501-511.*

PETER M, AYER F & EGLI S (2001) "Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition" *New Phytologist, **149**: 311-325.*

PONTECORVO G (1954) "Mitotic recombination in the genetic system of filamentous fungi" *Caryologia, Florence, **6** (Suppl.): 192-200.*

PRITSCH K, MUNCH J-C & BUSCOT F (2000) "Identification and differentiation of mycorrhizal isolates of black alder by sequence analysis of the ITS region" *Mycorrhiza, **10** (2): 87-93.*

RAIDL S & AGERER R (1992) "Studien an Ektomykorrhizen XLII" *Nova Hedwigia, **55** (3-4): 279-307.*

RAIDL S (1997) "Studien zur Ontogenie an Rhizomorphen von Ektomykorrhizen" *Bibliotheca Mycologica, **169**: 1-175.*

RAYNER A, BEECHING J, CROWE J & WATKINS Z (1999) "*Defining individual fungal boundaries" In* Structure and dynamics of fungal populations. Ed. WORRAL JJ. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Pp. 19-42.

READ DJ (1984) "*The structure and function of the vegetative mycelium of mycorrhizal roots" In* The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Ed. JENNINGS D & RAYNER A. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 215-240.

READ DJ (1991) "Mycorrhizas in ecosystems" *Experientia, **47**: 376-391.*

REDECKER D, SZARO TM, BOWMAN RJ & BRUNS TD (2001) "Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in a late-stage ectomycorrhizal successions" *Molecular Ecology, **10**: 1025-1034.*

SAWYER N, CHAMBERS S & CAIRNEY JW (1999) "Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests" *New Phytologist, **142**: 561-568.*

SAWYER N, CHAMBERS S & CAIRNEY JW (2001) "Distribution and persistence of *Amanita muscaria* genotypes in Australian *Pinus radiata* plantations" *Mycological Research, **105** (8): 966-970.*

SELOSSE M-A, COSTA G, DI BATTISTA C, LE TACON F & MARTIN F (1996) "Meiotic segregation and recombination of the intergenetic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*" *Current Genetics, **30**: 332-337.*

SELOSSE M-A, JACQUOT D, BOUCHARD D, MARTIN F & LE TACON F (1998) "Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in European forest plantations" *Molecular Ecology, 7: 561-573.*

SELOSSE M-A, MARTIN F, BOUCHARD D & LE TACON F (1999) "Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* spp. discrete genotypes in a Douglas fir plantation" *Applied and Environmental Microbiology, **65**: 2006-2014.*

SELOSSE M-A, MARTIN F & LE TACON F (2001) "Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir" *Mycological Research, **105** (5): 524-531.*

SENN-IRLET B (1997) "Reflections on the conservation of fungi in Switzerland" *Mycologia Helvetica, **9** (2): 3-18.*

SENN-IRLET B, BIERI G & HERZIG R (1997) "A provisional Red List of the endangered larger fungi in Switzerland" *Mycologia Helvetica, **9** (2): 81-110.*

SENN-IRLET B & BIERI G (1999) "Sporocarp succession of soil-inhabiting macrofungi in an autochthonous subalpine Norway spruce forest of Switzerland" *Forest Ecology and Management, **124**: 169-175.*

SETÄLÄ H, KULMALA P, MIKOLA J & MARKKOLA AM (1999) "Influence of ectomycorrhiza on the structure of detrital food webs in pine rhizosphere" *Oikos, **87**: 113-122.*

SIMARD S, PERRY D, JONES M, MYROLD D, DURALL D & MOLINA R (1997) "Net transfer of carbon between ectomycorrhizal trees species in the field" *Nature, **388**: 579-582.*

SINGER R (1975) *"The Agaricales in modern taxonomy"*. Ed. CRAMER J. Vaduz. Pp. 912.

SMITH ML, BRUHN JN & ANDERSON J (1992) "The fungus Armillaria bulbosa is among the largest and oldest living organisms" *Nature, **356**: 428-431.*

SMITH SE & READ DJ (1997) *"Mycorrhizal symbiosis, 2nd Ed."* Ed. Academic Press, San Diego, CA, USA. Pp. 605.

STENLID J (1985) "Population structure of *Heterobasidion annosum* as determined by somatic incompatibility, sexual incompatibility and isoenzyme patterns" *Canadian Journal of Botany **63**: 2268-2273.*

STEPHENSON SL & STEMPEN H (1994) *"Myxomycetes. A handbook of slime molds"*. Ed. Timber Press, Portland, Oregon, USA. Pp. 183.

STIJVE T (2001) "La pollution des champignons: le point sur l'arsenic" *Bulletin de la Fédération Myologique Dauphiné-Savoie, **160**: 39-47.*

STRAATSMA G, AYER F & EGLI S (2001) "Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot" *Mycological Research, **105** (5): 515-523.*

SWEDJEMARK G & STENLID J (1993) "Population dynamics of the root rot fungus *Heterobasidion annosum* following thinning of *Picea abies*" *Oikos, **66**: 247-254.*

SWOFFORD D (1999) "PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.08b8,Sunderland, Massachussetts,

TAGU D & MARTIN F (1996) "Molecular analysis of cell wall proteins expressed during the early steps of ectomycorrhiza development" *New Phytologist, **133**: 73-85.*

TAYLOR A, MARTIN F & READ DJ (2000) *"Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway Spruce (Picea abies (L.) Karst.) and Beech (Fagus sylvatica L.) along North-South transects in Europe". In* Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems. Ed. SCHULZE E. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 343-365.

TAYLOR D & BRUNS TD (1999) "Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities" *Molecular Ecology, **8**: 1837-1850.*

TERMORSHUIZEN A & SCHAFFERS A (1989) "The relation in the field between fruitbodies of mycorrhizal fungi and their mycorrhizas" *Agriculture, Ecosystems and Environment, **28**: 509-512.*

TERMORSHUIZEN A & SCHAFFERS A (1991) "The decline of carpophores of ectomycorrhizal fungi in stand of *Pinus sylvestris* L. in the Netherlands: possible causes" *Nova Hedwigia, **53**: 267-289.*

THOMPSON W, RAYNER ADM (1982) "Spatial structure of a population of *Tricholomopsis platyphylla* in a woodland site fungi" *New Phytologist, **92**: 103-114.*

TOMMERUP I, BARTON J & O'BRIEN P (1995) "Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*" *Mycological Research, **99** (2): 179-186.*

VAN DER HEIJDEN L (2000) "*Mycorrhizal symbioses of Salix repens: diversity and functional significance*" PhD Thesis, Wageningen Universiteit, Wageningen, Pays-Bas. Pp. 289.

VAN DER HEIJDEN L (in press-a) "Mycorrhizal associations of *Salix repens* L. communities in succession of dune ecosystems. I. Above- and below-ground views of ectomycorrhizal fungi in relation to soil chemistry" *Canadian Journal of Botany:*

VAN DER HEIJDEN L (in press-b) "Mycorrhizal associations of *Salix repens* L. communities in succession of dune ecosystems. II. Mycorrhizal dynamics and interactions of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi" *Canadian Journal of Botany:*

VERRALL AF (1937) "Variation in *Fomes igniarius* (L.) Gill" *Univ. Minn. Agric. Expt. Stn. Techn. Bull., 117.*

VILGALYS R, HOPPLE J & HIBBETT D (1991) "*Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy: the impact of molecular systematic studies" In* Generic concepts in mycology. Ed. CLÉMENÇON H. A Herbette Symposium in Lausanne, Lausanne, CH. Pp. 73-91.

VITOUSEK P, MOONEY H, LUBCHENCO J & MELILLO J (1997) "Human domination of the Earth's ecosystems" *Science, 277: 494-499.*

VOGT K, GRIER C & VOGT D (1986) "Production, turnover and nutrient dynamics of above- and belowground detritus of world forests" *Advances in Ecological Research, **15**: 303-377.*

VOIBLET C, DUPLESSIS S, ENCELOT N & MARTIN F (2001) "Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globosus- Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs" *Plant Journal, **25**: 181-191.*

VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, REIJANS M, VAN DE LEE T, HORMES M, FRIJTERS A, POT J, PELEMAN J, KUIPER M & ZABEAU M (1995) "AFLP: a new concept for DNA fingerprinting" *Nucleic Acids Research, **23**: 4407-4414.*

VRÅLSTAD T, HOLST-JENSEN A & SCHUMACHER T (1998) "The postfire discomycete *Geopyxis carbonaria* (Ascomycota) is a biotrophic root associate with Norway spruce (*Picea abies*) in nature" *Molecular Ecology, 7: 609-616.*

VRÅLSTAD T, FOSSHEIM T & SCHUMACHER T (2000) "*Piceirhiza bicolorata* - the ectomycorrhizal expression of the *Hymenoscyphus ericae* aggregate ?" *New Phytologist, **145**: 549-563.*

WALLANDER H, NYLUND J-E & SUNDBERG B (1992) "Ectomycorrhiza and nitrogen effects on root IAA: results contrary to current theory" *Mycorrhiza, **1**: 91-92.*

WALLENDA T & KOTTKE I (1998) "Nitrogen deposition and ectomycorrhizas" *New Phytologist **139**: 169-187.*

WATLING R (1971) "Polymorphism in *Psilocybe merdaria*" *New Phytologist, **70**: 307-326.*

WEISS M (1988) "*Ectomykorrhizen von Picea abies. Synthese, Ontogenie und Reaktion auf Umweltshadstoffe*" DISSERTATION, Universität München, München, D. Pp.

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE S & TAYLOR JW (1990) "*Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics" In* PCR protocols : a guide to methods and applications. Ed. INNIS M, GELFAND D, SNINSKY J & WHITE TJ. Academic Press, New York. Pp. 315-322.

WILLIAMS J, KUBELIK A, LIVAK K, RAFALSKI J & TINGEY S (1990) "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers" *Nucleic Acids Research, **18** (22): 6531-6535.*

WORRAL JJ (1994) "Population structure of *Armillaria* species in several forest types" *Mycologia, **86** (3): 401-407.*

WORRAL JJ (1997) "Somatic incompatibility in basidiomycetes" *Mycologia, **89** (1): 24-36.*

WORRAL JJ (1999) "*Fungal demography - mushrooming populations" In* Structure and dynamics of fungal populations. Ed. WORRAL JJ. Kluwer Academy Publishers, Dordrecht, Boston, London. Pp. 175-194.

YEH F, YANG R, BOYLE T, YE Z & MAO J (1997) "POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Calgary, USA,

ZHOU Z, MIWA M & HOGETSU T (1999) "Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR)" *New Phytologist, **144**: 55-63.*

ZHOU Z, MIWA M & HOGETSU T (2001) "Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations." *New Phytologist, **149**: 339-348.*

12 PUBLICATIONS

Dans le cadre du travail sur la cartographie des lichens de Suisse (1994-1995):

FIORE A-M. & CLERC P. 1996 "*Collema coccophorum*, une nouvelle espèce pour la Suisse" Meylania **11**:14-16.

CLERC P., FIORE A-M., BOUVIER C. & WILDI E. 1996 "Mapping of swiss lichens: past and present distribution of selected species" *Third IAL Symposium at the University of Salzburg, Austria.*

Dans le cadre du travail de diplôme (DEA) :

FIORE-DONNO A-M., 1997 "Les lichens épiphytes comme bioindicateurs de la pollution atmosphérique genevoise » *Saussurea **28** : 189-218.*

DEGLI AGOSTI R., COUACH O., FIORE-DONNO A.-M., CLERC P., DUBOIS A., COURVOISIER O.,HUSSY C., FEDRA K., GREPPIN H., HAURIE A. 1998 « Integration of biological indicators (lichens) of the state of the environment in a spatial (GIS) intelligent decision support system (IDSS) » In : The co-action between living systems and the planet, Ed. GREPPIN H, DEGLI AGOSTI R. and PENEL C., University of Geneva, Switzerland.

Dans le cadre du doctorat :

FIORE-DONNO A-M. & MARTIN F. 2001 "Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina, Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest" *New Phytologist **152** : in press.*

13 REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord le Prof. Heinz Clémençon, de l'Université de Lausanne et Francis Martin, du Centre INRA de Nancy, pour avoir accepté de diriger ce travail.

Je remercie Simon Egli et François Ayer (WSL, Birmensdorf) pour l'accès à la Réserve Mycologique de La Chanéaz, en particulier François Ayer pour son aide précieuse et son assistance sur le terrain, Béatrice Senn-Irlet (Université de Berne) pour avoir suggéré le sujet et ses conseils.

Cette thèse, en cotutelle entre l'Université de Lausanne et de Nancy I, a été partiellement financée par l'Université de Lausanne, où le travail de laboratoire a été effectué, et par un fonds spécial de l'office fédéral pour l'éducation et la science pour les cotutelles entre la Suisse et la France. La cotutelle a pu être obtenue grâce à l'appui efficace de M. R. Nägeli, secrétaire général de la conférence des recteurs des universités suisses ; je remercie également Mme Wettstein, secrétaire.

Toute ma reconnaissance va à l'équipe de Microbiologie Forestière de l'INRA de Champenoux, et Christine Delaruelle en particulier, pour leur sympathique soutien.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

14 ANNEXE 1

Article paru dans le

New Phytologist (2001) **152** : 533-542

New Phytologist

Research

Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest

Anne-Marie Fiore-Donno[1,2] and Francis Martin[1]

[1]UMR 1136 INRA–UHP Interactions Arbres/Micro-Organismes, Centre INRA de Nancy, 54280 Champenoux, France; [2]Université de Lausanne, Institut d'Ecologie, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Author for correspondence:
Francis Martin
Tel: +33 3 83 39 40 80
Fax: +33 3 83 39 40 69
E-mail: fmartin@nancy.inra.fr

Received: *9 May 2001*
Accepted: *13 August 2001*

Summary

• The knowledge of temporal and spatial structure of populations of ectomycorrhizal fungi, together with the origin and maintenance of their genetic variation, is critical to understanding how populations of these fungi establish, evolve and disappear at different stages of development of forest ecosystems.

• Identification and spatial delimitation of genets in populations of the ectomycorrhizal basidiomycetes, *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron* and *X. pruinatus* were inferred from the polymorphism of two codominant genetic loci, the nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and intergenic spacers (IGS), and anonymous dominant RAPD markers from basidiocarps collected in a mixed mature forest in the fungal reserve of La Chanéaz (Switzerland).

• The *L. amethystina* population showed numerous small, short lifespan genets; most closely spaced basidiocarps were genetically unique. Our results confirmed that sexual spore propagation is important in the life history of *L. amethystina* in undisturbed mature forests. By contrast, we found a single genet for each of the boletoid species colonizing a nearby plot indicating that clonal growth dominated.

• In La Chanéaz forest, the intrinsic biological features of the investigated species appear to play a higher role in colonization strategy than the features of local habitat.

Key words: ectomycorrhiza, genets, *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, *Xerocomus pruinatus*, population structure, RAPD, rDNA.

© *New Phytologist* (2001) **152**: 533–542

Introduction

Within forest soils, that host a large and diverse community of microbes that compete and interact with each other and with plant roots, ectomycorrhizal fungi are almost ubiquitous (Taylor *et al.*, 2000). The mutualistic ectomycorrhizal symbiosis allows trees to grow efficiently in suboptimal environments in boreal, temperate and some subtropical forest ecosystems (Smith & Read, 1997).

In a forest ecosystem, roots are exposed to an assemblage of several different species of ectomycorrhizal fungi (Taylor *et al.*, 2000; Dahlberg, 2001). Each species exists as a population of many individuals between which there is almost invariably some genetic variation (Debaud *et al.*, 1995). The fact that the host plants are exposed to mycobiont populations which are genetically diverse is a crucial consideration in forest ecology. Individual symbionts vary in their ability to colonize different genotypes of host-plant, their capacity to utilize mineral and organic soil nutrients, and in their adaptation to abiotic factors, such as soil pH and drought. Each of these abiotic and biotic factors might affect the course of a beneficial symbiosis and the establishment and subsequent dissemination of an individual fungal symbiont. Questions about the temporal and spatial structures of communities and populations of ectomycorrhizal fungi, together with the origin and maintenance of their genetic variation, are therefore critical when trying to understand how populations of these symbiotic fungi evolve and disappear at different stages of development of forest ecosystems (Egger, 1994; Dahlberg & Stenlid, 1995; Dahlberg, 2001). By implication, such a knowledge can

S.C.D. - U.H.P. Nancy 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

help in the understanding of biogeochimical cycles in forest ecosystems (Taylor *et al.*, 2000).

When and how genetic individuals of a given species (also referred to as genets) arrive at a site and how interactions between them evolve with maturation of fungal and host-plant populations are key questions in the assessment of dynamics in populations of ectomycorrhizal fungi. To understand the dispersal, establishment, and evolution of ectomycorrhizal populations, it is necessary to analyse these populations over several seasons and compare them at different successional stages of forest ecosystems at different habitats. The source and maintenance of genetic diversity within these ectomycorrhizal populations have been questioned in previous studies (Dahlberg & Stenlid, 1990, 1994; De La Bastide *et al.*, 1994; Gryta *et al.*, 1997, 2000; Bonello *et al.*, 1998; Selosse *et al.*, 1998, 1999; Gherbi *et al.*, 1999; Sawyer *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999, 2001; Guidot *et al.*, 2001; Redecker *et al.*, 2001). From these investigations, conclusions about the relative role of vegetative spreads vs spore establishment of ectomycorrhizal basidiomycete can be drawn (Egger, 1994; Dahlberg, 2001).

In open forest communities, genet recruitment from spore germination occurs massively during a short period early in the development of the population, leading to the development of numerous small genetically different individuals. Many early colonizers, such as *Hebeloma cylindrosporum* and *Laccaria* spp., appear to have relatively small nonpersistent genets (De La Bastide *et al.*, 1994; Gryta *et al.*, 1997, 2000; Selosse *et al.*, 1998). For some *Suillus* species, it is believed that no further genet recruitment from spores occurs after the initial colonizing phase and vegetative growth through hyphal networks appears to dominate in closed fungal communities (i.e. older forests). These communities are claimed to be resistant to genet establishment from spores, unless small disturbances in favourable sites create 'windows of opportunity' for local new genet recruitment (Dahlberg & Stenlid, 1995). Once thought to be dominated by a few, large (20–40 m) and long lasting genets, undisturbed closed forests can host populations of ectomycorrhizal basidiomycetes having high levels of genetic diversity characterized by small, short life-span genets (Gherbi *et al.*, 1999; Redecker *et al.*, 2001). Some ectomycorrhizal fungal populations found in undisturbed mature forest settings could therefore propagate by intense fruiting and spore germination. Whether population structure is related to microsite heterogeneity (Zhou *et al.*, 1999, 2001; Guidot *et al.*, 2001) or the biological/genetic features of the species is unknown. A way to validate the above mentioned models on the processes driving the evolution of genetic structure in populations of ectomycorrhizal fungi is to determine the genetic structure of a given species in different habitats differing by their ecological characteristics (Redecker *et al.*, 2001).

Laccaria amethystina is found in both recently established plantations and mature forests. We have investigated the genetic structure of *L. amethystina* populations in a 150-yr-old-monospecific beech (*Fagus sylvatica*) forest in the Vosges range in north-eastern France (Gherbi *et al.*, 1999). Surprisingly, a high density (> 5000 genets per ha) of small size, short life-span genets was found indicating an important role for sexual reproduction in this mature forest ecosystem. To assess whether this feature can be influenced by the habitat, we used the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to estimate DNA variation within a population of *L. amethystina* in the mixed forest of La Chanéaz (Swiss Mittelland). *Xerocomus chrysenteron* and *X. pruinatus*, two boletoid species were also analysed for comparative analysis.

Materials and Methods

Study site

The study was conducted in mixed (conifers and deciduous trees) stands in the mycological reserve of La Chanéaz in Swiss Mittelland (Fribourg canton) (46°48′ N 7°00′ E). The 75 ha-forest is located at an altitude of 575 m above sea level (asl) on a plateau made up of fresh water molasse, and the soil is mainly an acidic moder. It is a typical mixed forest, with deciduous and coniferous trees species, such as *Fagus sylvatica*, *Picea abies*, *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus sylvestris*, and *Abies alba*. The mean annual temperature is 9.4° and the mean annual precipitation is 900–1000 mm. The reserve was set up in 1979 by the Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research and mushroom harvesting is not allowed except for scientific investigations. Many studies on fungal ecology and protection were carried out on the site (Egli *et al.*, 1990). The climatic data, ectomycorrhizal communities and fungal species richness of the fungal reserve were described by Egli & Ayer (1997) and Straatsma *et al.* (2001).

Sampling plots

Within the study site, two sampling areas were established. Plot 59 (10 × 5 m) was used for sampling *Laccaria amethystina* Cooke basidiocarps, whereas those of *Xerocomus chrysenteron* (Bull.) Quél. and *X. pruinatus* (Fr. and Hök) Quél. were collected in the nearby plot 47 (10 × 10 m). Each of these areas was chosen to have mature trees at their edges. Plot 59 comprised two 140-yr-old *Pinus sylvestris* and two 40-yr-old *Fagus sylvatica* and several scattered young ecto- and endomycorrhizal trees (*F. sylvatica*, *Corylus avellana*, *Acer pseudoplatanus*, *Sorbus aucuparia*, and *Prunus padus*) (Fig. 1). Trees present on plot 47 comprised four 140-yr-old *Picea abies* and three understorey 40-yr-old *Fagus sylvatica* (Fig. 2). Plot 47 is surrounded by monospecific closed beech stands (F. Ayer, pers. comm.). Investigated plots were surrounded by 2 m high fences to avoid all inconvenient influences by mushroom pickers and large forest animals. The plot areas were gridded using pegs planted every meter and location of collected basidiocarps

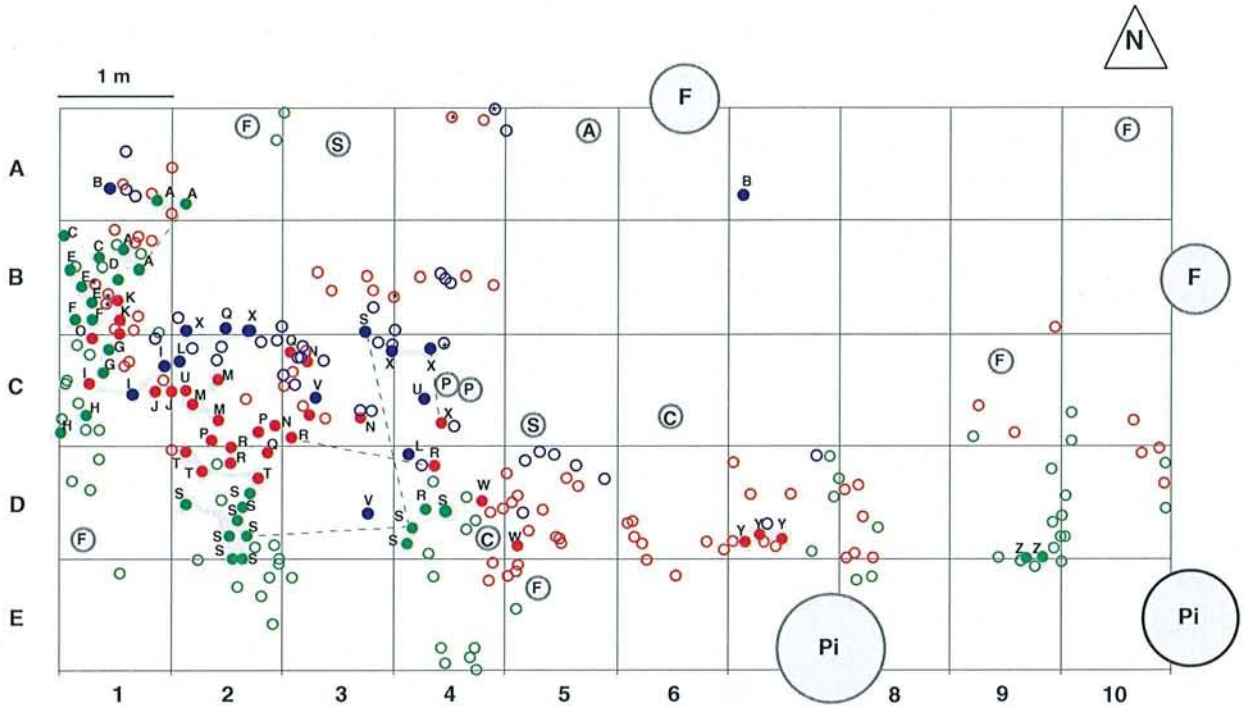


Fig. 1 Schematic depiction of relative positions of *Laccaria amethystina* basidiocarps and genets plotted on the reference mapping of plot 59 (5 × 10 m) (La Chanéaz forest). Standing trees are represented by grey closed circles, diameters to scale. Pi, *Pinus sylvestris*; F, *Fagus sylvatica*; C, *Corylus avellana*; A, *Acer pseudoplatanus*; S, *Sorbus aucuparia*; P, *Prunus padus*. Each blue (1997), red (1998) or green (1999) circle identifies a basidiocarp. Basidiocarps belonging to the same genet are represented by closed circles and are indicated with bold letters. The shaded zones encompass adjacent basidiocarps belonging to the same genets. Dotted lines connect different patches (ramets) of the same genet. Basidiocarps from neighbour-joining grouping A are indicated by an asterisk; they showed a 39–59% similarity of their RAPD patterns.

were recorded with a precision of a few centimetres (< 5 cm). Only fresh specimens without any signs of decay were used.

Survey of basidiocarps

In 1997–99, the fruiting period of *L. amethystina* was from early October to early November, whereas fruiting of *X. chrysenteron* and *X. pruinatus* was from mid-August to mid-November. The *Xerocomus* species were morphologically identified according to Binder & Fischer (1997) and their identification was confirmed by sequencing their nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and part of the large 25S rDNA subunit (GenBank accession # AF402139 and AF402140). The sites were visited up to twice a week to ensure an exhaustive sampling. In 1997, 1998, and 1999, we sampled a total of 280 *L. amethystina* basidiocarps (Table 1). The collection of *X. chrysenteron* totalized 146 basidiocarps (Table 1). *Xerocomus pruinatus* basidiocarps were rare and only 10 were collected (Table 1). After recording the coordinates of collected basidiocarps on a sampling grid, they were placed in a labelled plastic bag, transported to the laboratory and stored at −20° within 2 h.

Molecular methods

Total DNA was extracted directly from basidiocarp tissues using the hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)/proteinase K protocol as described by Henrion *et al.* (1994). PCR amplifications of the nuclear rDNA ITS and intergenic spacer 1 (IGS1) were carried out as described in Henrion *et al.* (1992, 1994), except that a BIOMETRA Uno-thermocycler system was used. RAPD was performed using primers 174 and 157 at high annealing temperature (50°C) according to Selosse *et al.* (1998). Amplification products were separated by electrophoresis using 1.4% (w/v) Sigma Wide Range agarose/0.8% agarose gel electrophoresis for 5 h (120 V h^{-1}) in a 1XTBE buffer system. Gels were stained with ethidium bromide and photographed with a digital camera.

The amplified nuclear ribosomal DNA ITS and IGS were sequenced using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Norwalk, USA), following the manufacturer's instructions. Reactions were then electrophoresed on either an ABI 373XL (at the Institut d'Ecologie de l'Université de Lausanne) or an ABI Genotyper 310 (at INRA-Nancy) automated sequencer (Applied Biosystems Inc.). Gels were tracked using the ABI Prism Sequencing

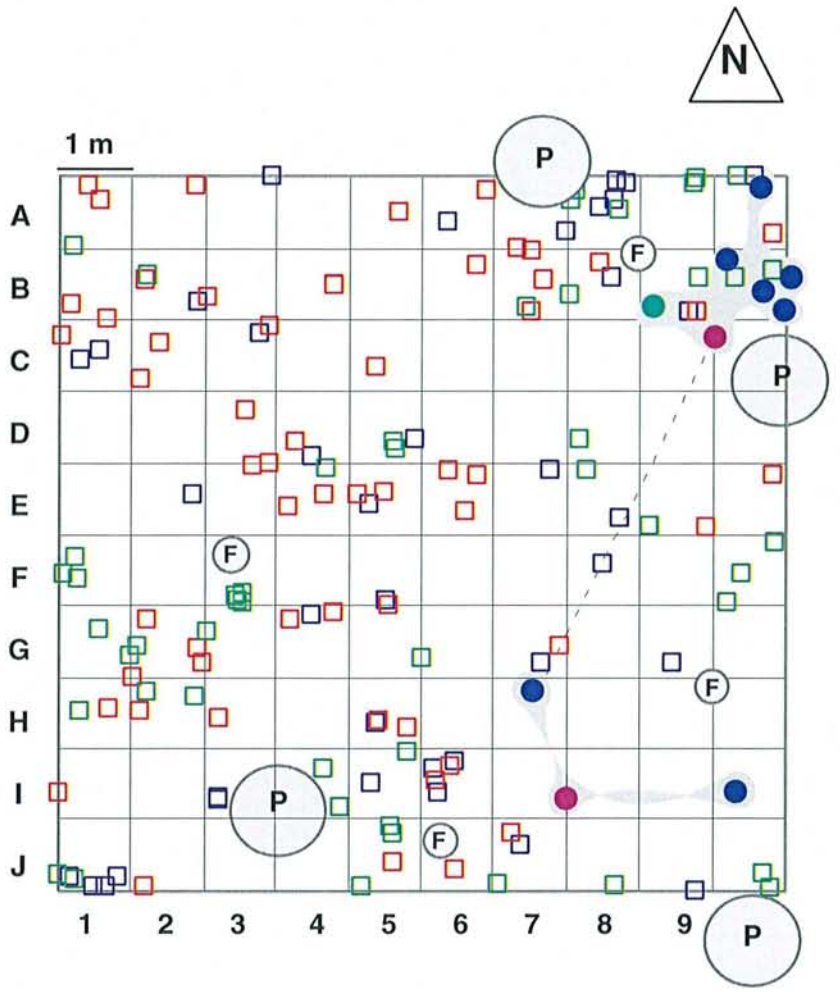


Fig. 2 Schematic depiction of relative positions of basidiocarps and genets of *Xerocomus chrysenteron* and *X. pruinatus* in plot 47 (10 × 10 m) (La Chanéaz forest). Standing trees (P, *Picea abies*; F, *Fagus sylvatica*) growing in the plot are represented by grey closed circles, diameters to scale. Basidiocarps of the single *X. chrysenteron* genet are represented by blue (1997), red (1998) or green (1999) open squares. Basidiocarps of the single *X. pruinatus* genet are represented by closed circles (dark blue, 1997; purple, 1998; dark green, 1999). The shaded zones encompass basidiocarps belonging to *X. pruinatus* large genet.

programme and raw sequence data were edited using the Sequence Analysis (Applied Biosystems Inc.) or Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) programmes.

Data and statistical analyses

The different *L. amethystina* basidiocarps were initially analysed by ITS and IGS1 typing and genets were distinguished by their RAPD patterns. We selected primers yielding both reproducible and polymorphic variations with well defined and darkly stained bands. RAPD were performed twice and only the bands that reproduced consistently were scored for each individual basidiocarp. Similar or identical samples were checked against each other by comparing their electrophoregrams side by side. Basidiocarps having identical ITS, IGS1 and RAPD banding patterns were regarded as belonging to the same genet and were mapped according to the distribution of collected basidiocarps. The area between adjacent basidiocarps sharing identical DNA patterns was assumed to represent the genet surface and the basidiocarps at the edge of this area were used to draw the borders of genets.

RAPD was scored as presence (1) or absence (0) of a band and a matrix of RAPD phenotypes was assembled. This rectangular matrix of individual × RAPD marker containing the band scoring information was transformed to resemblance matrices using four distance and similarity coefficients: simple matching, Sorensen and Jaccard similarity coefficients, and Euclidean distance for binary data (SIMIL in the R package 4.0d3; Casgrain & Legendre, 2001) with similar results. A dendrogram was constructed by unweighted pairgroup method with arithmetic mean (UPGMA) from the similarity matrices as a graphic representation of the relationships between samples using the R package (Casgrain & Legendre, 2001). The binary data matrix was also used for UPGMA and neighbour-joining (NJ) analyses in PAUP*4.08b (PPC/Altivec) (Swofford, 1999). The effect of spatial separation on genetic structure was tested by a regular Mantel test (Mantel & Valand, 1970) on the resemblance (RAPD pattern similarity) matrix and a Euclidean matrix of metric distance

Table 1 Characteristics of the populations of *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, and *X. pruinatus* of the fungal reserve La Chanéaz

	Samplings			
	1997	1998	1999	Total
Laccaria amethystina				
Basidiocarps sampled	59	116	105	280
IGS1 and RAPD analyses	44	90	75	209[a]
Genets detected	36	69	52	157
Basidiocarps per genet	1.22	1.30	1.44	1.33
Proportion of distinguishable genets	0.82	0.77	0.69	0.75
Genets per ha per year	7200	13 800	10 400	10 467
Xerocomus chrysenteron				
Basidiocarps sampled	39	56	51	146
IGS1 and RAPD analyses	39	56	51	146
Genets detected	1	1	1	1
Basidiocarps per genet	39	56	51	48
Proportion of distinguishable genets	0.02	0.01	0.02	0.02
Genets per ha per year	10	10	10	10
Xerocomus pruinatus				
Basidiocarps sampled	7	2	1	10
IGS1 and RAPD analyses	7	2	1	10
Genets detected	1	1	1	1
Basidiocarps per genet	7	2	1	3.3
Proportion of distinguishable genets	0.14	0.5	1	0.3
Genets per ha per year	10	10	10	10

[a]As a result of PCR failures, some of the basidiocarps produced no or poor results.

between individual basidiocarps (MANTEL module in the R Package). The significance of the correlation between the two matrices was tested by 999 random permutations of the similarity matrix to generate a null distribution of correlation coefficients (z-values). A significant result was inferred if ≥ 95% of the randomly generated statistics were greater than the observed value. Tests for goodness of fit to Hardy–Weinberg equilibrium were computed in POPGENE (Yeh *et al.*, 1997).

Results

Genetic structure and spatial distribution of *Laccaria amethystina*

Most of the basidiocarps were clustered in the westward part of the plot (Fig. 1). Genetic variability of the *L. amethystina* population was initially assessed by investigating the size polymorphism of the rDNA ITS and IGS1, regions showing intraspecific variability within *Laccaria* spp. (Henrion *et al.*, 1992; Selosse *et al.*, 1996, 1998; Gherbi *et al.*, 1999). No size polymorphism was found in the ITS (data not shown). By contrast, three different IGS1 patterns, differring by the number and size of the amplification products, were identified from among the 209 basidiocarps analysed. IGS1-type *AA*, presenting a single 700 bp DNA fragment, was detected in 113 basidiocarps (54%). Type *aa*, having a single DNA band at 760 bp, was found in 24 basidiocarps (12%). The remaining 72 analysed basidiocarps (34%) displayed a heterotype *Aa* with two bands at 700 and 760 bp. Sequencing of the two IGS1 types revealed a low divergence (0.8%) for most of the sequence, but a 47-bp-indel similar to the one observed in *L. amethystina* in the beech forest of Aubure (Gherbi *et al.*, 1999). The IGS1 types were treated as codominant biallelic markers in a test for Hardy–Weinberg equilibrium expectation in the 209 isolates. Isolates which possessed a single band (700- or 760-bp) were treated as homozygotes (*AA*, *aa*) and isolates with two bands (700- and 760-bp) were treated as heterozygotes (*Aa*). A slight heterozygote deficit was observed in the IGS1 locus (expected and observed heterozygotes: 0.41 and 0.35, respectively; expected and observed homozygotes: 0.58 and 0.64, respectively). A Chi-square test returned the genotype distribution in the IGS1 locus to be significantly different from the genotype distribution under Hardy–Weinberg equilibrium (4.4%; $P < 0.05$). The heterozygote deficit in the IGS1 locus suggests that inbreeding may occur, although this process should be limited by mating types. However, the significant level of heterozygosity indicates that outcrossing, heterothallic reproductive mode was taking place in this population.

Further molecular typing was carried out using RAPD to ascertain the DNA diversity amongst collected *L. amethystina* basidiocarps. The two chosen primers yielded 59 scorable markers that ranged in size from 180 to 1200 bp. Up to 157 unique RAPD banding patterns were identified indicating the existence of a large DNA variation in the analysed population.

Most of the DNA bands were only detected in a few basidiocarps. Only two DNA fragments, generated by primer 157, were found in all DNA samples. The mean 'proportion of distinguishable genets' (i.e. total number of unique RAPD patterns divided by the sample number) from this sample of the population of La Chanéaz forest was 0.75 (Table 1). We found a similar high value (0.61) in *L. amethystina* populations surveyed in a beech forest in the Vosges mountains (north-eastern France) (Gherbi *et al.*, 1999).

Basidiocarps belonging to the same genet were not necessarily collected on the same day. The persistence of basidiocarps belonging to a discrete genet varied from 5 to 22 d. Only six genets (< 4%) were detected for more than 1 yr (Fig. 1). Genets I, Q, U, and X were detected in both 1997 and 1998, whereas a single genet (i.e. R) was found in 1998 and 1999 samplings. The greatest distance separating two basidiocarps belonging to the same genet and collected in two consecutive years ranged from 0.3 (genet I) to 2.2 m (genet Q & U). Basidiocarps of the largest genet, so-called S, were sampled in 1997 and 1999 (Fig. 1).

The limits of *L. amethystina* intermingling individuals in plot 59 were often blurred (Fig. 1). The average number of basidiocarps per genet was 1.33 (Table 1). Even in areas of high sampling density (e.g. coordinates B1, C1 and C2), most genets were found only once. The largest genet (S) comprised 13 basidiocarps, all having the IGS1-type *AA*, and its two main patches covered an area of *c.* 0.75 m^2 (coordinates D2/D4). The average size (largest detectable distance across a genet) of the 26 genets comprising more than one basidiocarp was 1.1 m, ranging from a few cm (genet J, coordinates C1) to 5.40 m (genet B, coordinates A1 to A7). Similarity between genets was assessed by UPGMA (not shown) and NJ (Fig. 3) analyses of RAPD patterns. These statistical analyses produced the same tree topology. Genets comprising at least three basidiocarps formed easily distinguable clusters (labelled shaded boxes in Fig. 3). However, the dendrogram illustrate well the limited number of individuals sharing similar RAPD phenotypes. As an example, the similarity of RAPD patterns clustering at the top of the NJ tree (the so-called grouping A including individuals C714, C807, B731, B817, B824, C802 and C810) ranged from 0.39 to 0.59. These statistical analyses confirmed the lack of a close genetic relationship between most basidiocarps and genets, although breeding occurred as suggested by the significant proportion of heterozygotes at the IGS1 locus (see above). Some of the most divergent RAPD patterns originated from adjacent basidiocarps (see coordinates B1 and C1). The Mantel's test showed no significant correlation between the spatial distance matrix and the similarity matrix of RAPD patterns ($r = -0.04$, $P = 0.13$) suggesting that spatial distance between basidiocarps plays a marginal role in structuring this population.

Spatial distribution and DNA typing of *Xerocomus chrysenteron* and *X. pruinatus*

Basidiocarps of *X. chrysenteron*, harvested from 1997 to 1999, were scattered over plot 47 (Fig. 2), as it was recorded since 1992 (F. Ayer, pers. comm.). By contrast, basidiocarps of *X. pruinatus* were restricted to a surface of 40-m^2, less than half of the plot (coordinates H7 to A10). Amplification of the ITS from *X. chrysenteron* and *X. pruinatus* generated a single 740 bp-band (data not shown). By contrast, the size of the amplified IGS1 showed a great difference between the two species. *X. chrysenteron* had a single IGS1 product of 500 bp, whereas *X. pruinatus* had two bands of 800 and 900 bp.

RAPD typing and spatial distribution of genets

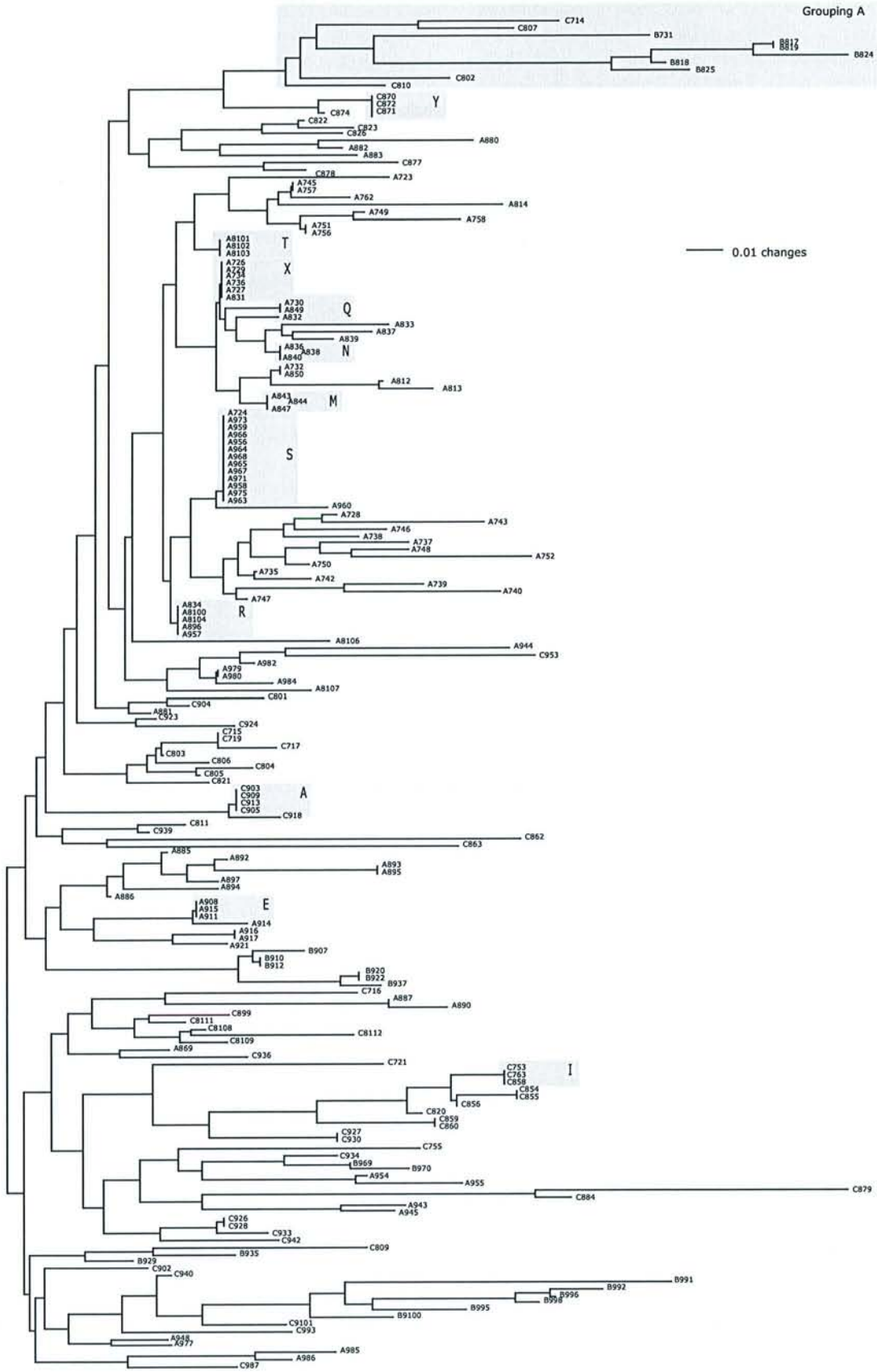
RAPD produced identical patterns, totalling 13 reliable markers, for all *X. chrysenteron* basidiocarps collected over the 3 yr survey. This genetic homogeneity suggests the presence of a single long-lasting individual in the plot covering a surface as large as 100 m^2 (Fig. 3). An attempt to define the edges of this individual was made during the autumn of 2000 by collecting five basidiocarps outside plot 47: four in the northward adjacent plot (up to 50 m), and one 60 meters south-eastward. An additional 10 basidiocarps were collected inside the plot (data not shown). The same IGS and RAPD patterns were found for all basidiocarps. The maximum distance recorded between two basidiocarps from this single genet was, thus, *c.* 110 m.

All *X. pruinatus* basidiocarps collected inside plot 47 over the 3 yr belonged to the same genet. The surface covered by this individual was at least 40 m^2 and it was restricted to the eastern part of the plot (Fig. 2). Five basidiocarps, collected outside the plot in the autumn of 2000, belonged to four different genets (data not shown) suggesting that this large individual did not extend outside plot 47.

Discussion

Genet size in ectomycorrhizal fungi can reveal features of colonization strategy and growth. Fruiting body and ectomycorrhiza surveys have shown that the size of the genets from ectomycorrhizal fungi may vary with the forest age. It is widely

Fig. 3 Dendrogram constructed by neighbour-joining analysis showing the RAPD relationships among *Laccaria amethystina* basidiocarps collected in plot 59 (5 × 10 m) of La Chanéaz forest. Analysis was conducted using the distance search algorithm of PAUP 4.0b8. Scale represents 0.01 changes. The letters indicate the IGS1 type (A, type *AA*; B, type *aa*; and C, type *Aa*), the following number stands for the sampling year (7, 1997; 8, 1998; 9, 1999) and the remaining numbers indicate the sample number. Genets comprising more than three basidiocarps are indicated by shaded boxes. Grouping A which includes individuals showing a 39–59% similarity of their RAPD pattern is shown as a shaded box at the tree top. The shaded box at the tree top indicates the grouping A referred to in Figure 1.


Grouping A
0.01 changes
C714
C807
B731
B817
B819
B824
B818
B825
C802
C810
C870
C872
C871
Y
C874
C822
C823
C826
A880
A882
A883
C877
C878
A723
A745
A757
A762
A814
A749
A758
A751
A756
A8101
A8102
A8103
T
A726
A729
A734
A736
A727
A831
X
A730
A849
A832
Q
A833
A837
A839
A836
A838
A840
N
A732
A850
A812
A813
A843
A844
A847
M
A724
A973
A959
A966
A956
A964
A968
A965
A967
A971
A958
A975
A963
S
A960
A728
A743
A746
A738
A737
A748
A752
A750
A735
A742
A739
A740
A747
A834
A8100
A8104
A896
A957
R
A8106
A944
C953
A982
A979
A980
A984
A8107
C801
C904
A881
C923
C924
C715
C719
C717
C803
C806
C804
C805
C821
C903
C909
C913
C905
C918
A
C811
C939
C862
C863
A885
A892
A893
A895
A897
A894
A886
A908
A915
A911
E
A914
A916
A917
A921
B907
B910
B912
B920
B922
B937
C716
A887
A890
C899
C8111
C8108
C8112
C8109
A869
C936
C721
C753
C763
C858
I
C854
C855
C856
C820
C859
C860
C927
C930
C755
C934
B969
B970
A954
A955
C879
C884
A943
A945
C926
C928
C933
C942
C809
B935
B929
C902
C940
B991
B992
B996
B998
B995
B9100
C9101
C993
A948
A977
A985
A986
C987

believed that the presence of many small genets indicates multiple spore establishment events and large genets reflects predominant vegetative spread (Dahlberg & Stenlid, 1990, 1995; Dahlberg, 2001). Estimated densities of populations range from 30 to 5200 genets ha^{-1} depending on the species and forest age (Gryta *et al.*, 1997; Gherbi *et al.*, 1999; Dahlberg, 2001; Redecker *et al.*, 2001). Populations of *Suillus bovinus* and *S. variegatus* in old conifer forests consist mostly of discrete, large (up to 27 m) and old (> 150 yr) genets which do not seem to intermingle (Dahlberg & Stenlid, 1994, 1995; Dahlberg, 2001). One of the largest genet of ectomycorrhizal fungi to date (300 m^2) has been found in *Suillus pungens* in a Bishop pine forest in coastal California (Bonello *et al.*, 1998). It was thus thought that vegetative growth and dissemination over long periods dominate over spore colonization in established forests typified by canopy closure, lack of young trees, and organic N-rich litter (Dahlberg & Stenlid, 1995). However, recent studies (Gherbi *et al.*, 1999; Redecker *et al.*, 2001) have demonstrated that undisturbed mature forests may host fungal populations characterized by numerous, short life-span genets relying mainly on spore dissemination for local colonization. Initial genet recruitment from spores followed by vegetative spread (large, old genets) and repeated recruitment from spores (small, short life-span genets) may be considered as two extremes of a continuum rather than as two clearly distinct recruitment patterns in ectomycorrhizal basidiomycetes.

As spatial structuration of populations of ectomycorrhizal fungi differs between taxa (Dahlberg, 2001), we have analysed populations of three ectomycorrhizal basidiomycetes, *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, and *X. pruinatus* in the undisturbed mixed forest of La Chanéaz. The investigated stands comprised 40-yr-old and 140-yr-old conifer and hardwood species, together with a few young, mainly endomycorrhizal, trees. Molecular typing of sampled basidiocarps revealed two constrasting genetic structures for these species. Both *X. chrysenteron* and *X. pruinatus* populations consisted of a discrete, large genet. Assuming a mean growth rate of 0.5 m per year for the underground mycelium of ectomycorrhizal fungi (Dahlberg & Stenlid, 1994; Bonello *et al.*, 1998; Selosse *et al.*, 1998), the founder of the 110 m-large *X. chrysenteron* clone probably associated with the older *Picea abies* when they established 140-yr-ago. The closely related species *X. pruinatus* also formed large clones (40 m^2) in the same plot. *X. chrysenteron* collected in the beech forest of Aubure (Vosges) (Gherbi *et al.*, 1999) also pertained to a single large genet (> 100 m^2) (H. Gherbi & F. Martin, unpublished). These results were consistent with the findings of Dahlberg & Stenlid (1994, 1995) showing that, although they produce a considerable number of spores, many boletoids extend mostly by vegetative growth and the genet establishment from spore germination progressively decreased in the ageing population. Their capacity to develop extensive hyphal cords probably enables the large genets to visit the roots of more trees and to pool more total C than species which are more common, but produce smaller genets (Bonello *et al.*, 1998).

By contrast, the *L. amethystina* population was made of numerous discrete genets (up to 13800 ha^{-1}). Among the analysed genets, only 4% of the identified genets fruited the following years suggesting a considerably large mortality of genets. The genet size varied from the mere diameter of the basidiocarp (i.e. *c.* 2–4 cm) to 5.40 m in length. The present results are in agreement with a previous survey carried out in a different habitat, a 150-yr-old monospecific beech forest situated at an altitude of 1000 m asl (Gherbi *et al.*, 1999). In the latter study conducted in the Vosges mountains (north-eastern France), *L. amethystina* populations exhibited up to 5200 short life-span, small-size genets per ha. The dramatic renewal of genets suggested a recolonization of the site by new genets each year and/or erratic fruiting of 'cryptic' below ground genets (Gherbi *et al.*, 1999). The numerous *L. amethystina* genets are likely to have arisen from repetitive establishment from basidiospores, as suggested by their small size. Large amounts of feeder roots with high turnover rates (Vogt *et al.*, 1986) give constant opportunities for ectomycorrhizal fungi to become established (Kranabetter & Wylie, 1998). The growth pattern of *L. amethystina* suggests that these new host root tips are colonized each season, the spreading of the new genets probably following the elongation of roots. In situations with strong intraspecific competition we could expect a reduced clonal diversity because fewer fitter genets would predominate. Yet, a high DNA diversity was maintained at both sites analysed (i.e. Aubure and La Chanéaz). Obviously, none of the genet produced sufficient clonal offspring to contribute to its predominance.

Colonization by numerous small-sized genets, with high fruiting rates, is reminiscent of young natural populations of ectomycorrhizal fungi (e.g. *Suillus bovinus* (Dahlberg & Stenlid, 1990); *Laccaria bicolor* (De la Bastide *et al.*, 1994; Selosse *et al.*, 1998, 1999) and *Hebeloma cylindrosporum* (Gryta *et al.*, 1997; Guidot *et al.*, 2001)). This population structure was postulated to arise in recently established or disturbed stands (Dahlberg & Stenlid, 1995). Recent investigations have however, shown that this 'early stage' population structure is also found for ectomycorrhizal basidiomycetes in closed undisturbed forest settings (Gherbi *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1999, 2001; Redecker *et al.*, 2001).

The population structure may depend on: the dispersal of the spores; the extent of growth of the monokaryotic mycelium (that germinated from the basidiospores of the previous seasons) and the opportunities for mating between compatible monokaryotic mycelia that thus occur; and the persistence of the below-ground mycelia. The spatial distribution of *H. cylindrosporum* (Guidot *et al.*, 2001) and *Suillus grevillei* (Zhou *et al.*, 2001) genets in the soil showed that the development of basidiocarps was tightly correlated with that of the extramatrical and ectomycorrhizal mycelia of the same genet. Disappearance of basidiocarps of these species at a given place

was associated with the disappearance of the corresponding subterranean mycelia within 1 yr. If this behaviour is also true for *L. amethystina*, basidiocarp analysis appears to reflect both the genetic diversity and the spatial structure of its subterranean populations.

Microsite heterogeneity which promotes the coexistence of genets through diversifying selection has been hypothesized to account for the mechanisms underlying the maintenance of a high level of genotypic diversity in fungal species (Frankland, 1998). Because *Xerocomus* species have been able to maintain a clonal structure for decades, this hypothesis alone is insufficient to explain the high genetic diversity of genets in aged forest ecosystems. The fact that the investigated stands are included in a fungal reserve protected by a fence precludes any major perturbation related to large animal and human activities.

The low similarity between RAPD patterns (Fig. 2) and the low correlation between spatial distance separating basidiocarps and the RAPD similarity matrix (Mantel's test) indicate that *L. amethystina* genets found on plot 59 did not arise from a common (or a few) colonization event. These results suggest that establishment of novel genets and colonization of host root tips are largely a stochastic process, with much spore dispersal occurring on a scale greater or equal to that of this study (50 m^2). The results of this study are somewhat at odds with the allelic analysis on *S. grevillei* (Zhou *et al.*, 2001) which has shown that the spread of alleles within and between populations might be by repeats of short-distance spore dispersal.

In conclusion, the prominent role of the sexual spore reproduction over the perennial spread of the vegetative mycelium in the soil for ectomycorrhizal species, such as *L. amethystina*, is not restricted to pioneer situations, but is found in stable established forest ecosystems. These species are able to establish novel genets from spores repeatedly over several decades without apparent perturbation of the sites and/or host plant genetic structure. This suggests a rapid alteration of the subterranean parts of *L. amethystina* genets and a constant colonization of new feeder roots. Knowing the spatial structure of the studied populations through the fruiting body location will facilitate the characterization of their genetic structure at the level of ectomycorrhizal roots and extramatrical hyphae using codominant genetic loci (Guidot *et al.*, 2001). So far, investigations on populations of ectomycorrhizal fungi have mainly been descriptive or correlative and no experimental study has yet been performed to manipulate these populations. Identification of causal processes controlling the dynamics and structure of ectomycorrhizal populations will advance our understanding of forest ecosystems.

Supplementary Material

A map showing the location of study sites, photographs of the ITS and RAPD gels, DNA sequences, distance matrices and UPGMA and NJ trees are available at the following URL: http://mycor.nancy.inra.fr/Aubure/Aubure.html

Acknowledgements

This study was part of Anne-Marie Fiore-Donno's Ph.D. project. It was partially funded by a scholarship from the University of Lausanne and the Special Found of the Swiss Federal Office for Education and Science for Switzerland-France Ph.D. joint programmes. We thank Prof. Heinz Clémençon (University of Lausanne) for his constant support; Simon Egli and François Ayer (WSL, Birmensdorf) for allowing us to establish field sites in the fungal reserve of La Chanéaz for these studies; Christine Delaruelle (INRA-Nancy) for her helpful assistance in molecular methods; François Ayer for his kind assistance and advices in fruiting body surveys; Jesus Diez for stimulating discussions; two anonymous referees for their constructive comments; and Beatrice Senn-Irlet (University of Bern) for suggesting this investigation and her support. Funding was provided by the Bureau des Ressources Génétiques and INRA to FM.

References

Binder M, Fischer M. 1997. Molekularbiologische Charakterisierung der Gattungen *Boletellus* und *Xerocomus: Xerocomus pruinatus* und verwandte Arten. *Bollettino Del Gruppo Micologico G. Bresadola* 40: 79–90.

Bonello P, Bruns TD, Gardes M. 1998. Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist* 138: 533–542.

Casgrain P, Legendre P. 2001. *The R package for multivariate and spatial analysis, version 4.0d3 – User's Manual.* Département Des Sciences Biologiques, Université de Montréal. [WWW document] URL http://www.fas.umontreal.ca/BIOL/legendre/.

Dahlberg A. 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdiciplinary field. *New Phytologist* 150: 555–562.

Dahlberg A, Stenlid J. 1990. Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytologist* 115: 487–493.

Dahlberg A, Stenlid J. 1994. Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L. F.) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist* 128: 225–234.

Dahlberg A, Stenlid J. 1995. Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. *Canadian Journal of Botany* 73: S1222–S1230.

De La Bastide PY, Kropp BR, Piché Y. 1994. Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytologist* 127: 547–556.

Debaud JC, Marmeisse R, Gay G. 1995. Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. In: Varma AK, Hock B, eds. *Mycorrhiza: structure, molecular biology and function.* Berlin, Germany: Springer-Verlag, 79–114.

Egger KN. 1994. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* 73: S1415–S1422.

Egli S, Ayer F. 1997. Est-il possible d'améliorer la production de champignons comestibles en forêt? L'exemple de la Réserve mycologique de La Chanéaz en Suisse. *Revue Forestière Française* XLIX: 235–243.

Egli S, Ayer F, Chatelain F. 1990. Der Einfluss des Pilzsammelns auf die Pilzflora. *Mycologia Helvetica* 3: 417–428.

Frankland JC. 1998. Fungal succession – unravelling the unpredictable. *Mycological Research* 102: 1–15.

Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA, Martin F. 1999. High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* 8: 2003–2013.

Gryta H, Debaud JC, Effosse A, Gay G, Marmeisse R. 1997. Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology* 6: 353–364.

Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R. 2000. Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity* 84: 294–302.

Guidot A, Debaud JC, 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.

Henrion B, Chevalier G, Martin F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98: 37–43.

Henrion B, Le Tacon F, Martin F. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122: 289–298.

Kranabetter JM, Wylie T. 1998. Ectomycorrhizal community structure across forest openings on naturally regenerated western hemlock seedlings. *Canadian Journal of Botany* 76: 189–196.

Mantel N, Valand RS. 1970. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* 26: 547–558.

Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD. 2001. Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* 10: 1025–1034.

Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JWG. 1999. Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests. *New Phytologist* 142: 561–568.

Selosse M-A, Costa G, Di Battista C, Le Tacon F, Martin F. 1996. Segregation and recombination of ribosomal haplotypes in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* monitored by PCR and heteroduplex analysis. *Current Genetics* 30: 332–337.

Selosse M-A, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1998. Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in European forest plantations. *Molecular Ecology* 7: 561–573.

Selosse M-A, Martin F, Bouchard D, Le Tacon F. 1999. Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a Douglas fir plantation. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2006–2014.

Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn.* London, UK: Academic Press.

Straatsma G, Ayer F, Egli S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycological Research* 105: 515–523.

Swofford DL. 1999. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.08b8.* Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.

Taylor AFS, Martin F, Read DJ. 2000. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] and beech (*Fagus sylvatica* L.) along North-South transects in Europe. In: Schulze ED, ed. *Carbon and nitrogen cycling in European forest ecosystems – ecological studies.* Berlin, Germany: Springer Verlag, 343–365.

Vogt KA, Grier CC, Vogt DJ. 1986. Production, turnover and nutrient dynamics of above- and belowground detritus of world forests. *Advances in Ecological Research* 15: 303–377.

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBYeZH, Mao JX. 1997. *POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis.* Calgary, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.

Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T. 1999. Analysis of genetic structure of a *Suillus grevillei* population in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytologist* 144: 55–63.

Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T. 2001. Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations. *New Phytologist* 149: 339–348.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Université HENRI POINCARÉ
NANCY 1

Madame **FIORE-DONNO Anna-Maria**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARE, NANCY-I

en BIOLOGIE FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 10 DEC. 2001 n° 598

Le Président de l'Université

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
LE PRÉSIDENT

Cl. BURLET

Université Henri Poincaré, Nancy I
24-30 rue Lionnois - B.P. 3069 - 54013 NANCY CEDEX
Tél. : 03 83 85 48 00 - Fax : 03 83 85 48 48

RESUME

La symbiose ectomycorhizienne est une relation intime qui s'établit entre certains groupes de champignons et les racines de la plupart des arbres en climat tempéré. Dans les forêts de nos régions, elle joue un rôle écologique prépondérant.

S'il est établi que les espèces de champignons symbiotiques se succèdent souvent selon certains schémas, plus ou moins variables, suivant l'évolution de la forêt, la succession ou le maintien des populations qui composent chaque espèce est un domaine encore peu exploré. Or, la connaissance de la **structure spatio-temporelle des populations des champignons ectomycorhiziens** est essentielle pour comprendre comment chaque espèce s'établit, perdure et disparaît. Elle permet aussi d'inférer leur mode de reproduction par l'analyse de la variation génétique.

Dans la forêt de la **réserve mycologique de la Chanéaz** (Suisse, canton de Fribourg), les populations de trois espèces de Basidiomycètes ectomycorhiziens *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron* et *Xerocomus pruinatus* ont été intensivement étudiées pendant trois ans.

L'analyse génétique, conduite par différentes **méthodes moléculaires** (amplification des régions ITS et IGS1 de l'ADN ribosomal, amplification aléatoire de nombreux fragments - RAPD) a permis de révéler la **structure génétique** de ces trois espèces dans des parcelles d'étude, ainsi que son évolution.

Nous n'avons trouvé qu'un seul profil par espèce chez *Xerocomus chrysenteron* et *Xerocomus pruinatus*, dans une parcelle d'étude de 100 m^2. Chez *Xerocomus chrysenteron* en particulier, les 146 champignons récoltés en trois ans étaient génétiquement identiques, laissant supposer un mycélium souterrain très étendu (en tout cas de 100 m^2), et par conséquent très ancien.

- **La persistance de ces deux espèces serait essentiellement due à la croissance végétative du mycélium, alors que la reproduction sexuée semble intervenir rarement.**

Contrastant avec ces résultats, la population de *Laccaria amethystina* a montré une diversité génétique élevée, puisque nous avons pu distinguer 157 génets dans une parcelle de 50 m^2, avec un fort renouvellement chaque année. Chez cette espèce, presque chaque champignon est un «individu» distinct de son voisin, même proche, dont le mycélium n'atteindrait que rarement une taille supérieure à quelques cm^2.

- **La reproduction sexuée, par les spores, semble être le moyen de reproduction privilégié, alors que la croissance végétative du mycélium paraît limitée.**

Dans la forêt de La Chanéaz, les caractéristiques génétiques intrinsèques des espèces étudiées semblent jouer un rôle plus important dans les stratégies de colonisation et de maintien que ne le fait l'habitat.

Mots-clés: ectomycorhize, génotypes, *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, *Xerocomus pruinatus*, génétique des populations, structure des populations, RAPD, ADN ribosomal.