



AVERTISSEMENT

Ce document 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. 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.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.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>



Faculté des Sciences
U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé
D.F.D. Biologie Végétale & Forestière

F.A.L. - Völkenrode
Institut für Bodenbiologie



Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré-Nancy I

en Biologie Végétale et Forestière

par Daniel WIPF

Polymorphismes protéique et génomique au sein des
Morchellaceae - Mise au point d'un outil moléculaire adapté à
l'étude de l'écologie du genre *Morchella* en milieu forestier

Soutenue publiquement le 27 octobre 1997 devant la commission d'examen:

Membres du jury:

Président:	M. B. BOTTON	Professeur, Université H. Poincaré, Nancy I
Rapporteurs:	Mme M.F. ROQUEBERT	Professeur, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris
	Mme N. SMITH/WEBER	Professeur, Université de l'Oregon, U.S.A
Examineurs:	M. F. BUSCOT	Professeur, Université de Jena, Allemagne
	M. F. LE TACON	Directeur de recherche, I.N.R.A. de Nancy
	M. F. MARTIN	Directeur de recherche, I.N.R.A. de Nancy



ABREVIATIONS

A	:	Adénine
AAT	:	Aspartate Aminotransférase
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ADN _r	:	Acide Désoxyribonucléique ribosomal
APS	:	Ammonium Persulfate
C	:	Cytosine
CTAB	:	Bromure
EDTA	:	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EES	:	Early Encrusting Sclerotia
EGTA	:	Ethylene Glycol -bis(b-Amino-ethyl ether) N, N, N', N' - Tetra acetic Acid
G	:	Guanine
GAPD	:	Glycéraldéhyde Phosphate Déshydrogénase à NAD
GDH	:	Glutamate Déshydrogénase
GPI	:	Glucose Phosphate Isomérase
GS	:	Glutamine Synthétase
IGS	:	Intergenic Spacer (espaceur intergénique)
ITS	:	Internal Transcribed Spacer (espaceur interne transcrit)
LIS	:	Late Isolated Sclerotia
MDH	:	Malate Déshydrogénase
MTT	:	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NAD(P)	:	Nicotinamide Dinucléotide Oxydée (Phosphate)
NBT	:	Nitro Blue Tetrazolium
P5P	:	Pyridoxal-5-Phosphate
pb	:	paires de bases
PCR	:	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par l'ADN polymérase)
PMS	:	Phénasine Méto Sulfate
PVP	:	Polyvinylpyrrolidone
PVPP	:	Polyvinylpolypyrrolidone
RFLP	:	Restriction Fragment Length Polymorphism

(polymorphisme de longueur des fragments de restriction)

SOD	:	Superoxyde Dismutase
T	:	Thymine
TBE	:	Tris-Boric acid-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
TEMED	:	Tétraméthyl-éthylènediamine
Tris	:	Tris (hydroxyméthyl) aminométhane
UV	:	Ultra Violet

SOMMAIRE



ABREVIATIONS	3
Avant-propos	1
Chapitre I: Introduction	3
1.1 Les champignons et les autres organismes.....	4
1.1.1 Les saprophytes des débris végétaux.....	5
1.1.1.1 Les champignons des glucides solubles ou faciles à hydrolyser.....	6
1.1.1.2 Les champignons cellulolytiques.....	6
1.1.1.3 Les champignons ligninolytiques.....	7
1.1.2 La symbiose avec les organismes chlorophylliens.....	7
1.1.2.1 Les Lichens.....	7
1.1.2.2 Les Mycorhizes.....	8
Les Ectomycorhizes.....	9
Les Ectendomycorhizes.....	9
Les Endomycorhizes.....	9
1.1.2.3 Les endophytes.....	11
1.1.3 Les champignons parasites des végétaux.....	12
1.1.4 Animaux et champignons.....	12
La mycophagie avec dispersion des spores.....	13
La mycophagie symbiotique.....	13
Saprophytisme fongique de déchets animaux.....	13
Le parasitisme et la prédation.....	14
1.1.5 Champignons et champignons.....	14
1.2 La morille.....	15
1.2.1 Classification.....	15
1.2.1.1 Classification selon Boudier (1897-1907).....	15

1.2.1.2 Classification selon Heim (1936).....	16
1.2.1.3 Classification selon Dennis (1978).....	17
1.2.1.4 Classification selon Jacquetant (1984).....	17
1.2.2 Biologie de la morille.....	18
1.2.2.1 Les spores.....	18
1.2.2.2 Le mycélium.....	19
1.2.2.3 Les sclérotés.....	19
1.2.2.4 Le stade conidien.....	19
1.2.2.5 L'homo ou l'hétérothallisme des morilles.....	20
1.2.3 Ecologie de la morille.....	20
1.2.3.1 Epoque de la fructification et rythme biologique.....	20
1.2.3.2 Facteurs stationnels.....	21
Nature du sol.....	21
L'ensoleillement.....	21
Topographie et altitude.....	21
Données phytosociologiques.....	22
a/ Autres champignons présents sur les stations de morilles.....	22
b/ Plantes supérieures.....	22
Habitats perturbés.....	25
1.2.3.3 Rythmes endogènes.....	25
1.2.3.4 Synthèse des données sur l'écologie de la morille.....	26
Chapitre II: Objectifs.....	33
Chapitre III: Matériels et méthodes.....	36
3.1 Matériel fongique.....	37
3.1.1 La Morille (<i>Morchella</i> sp.).....	37
3.1.2 Conditions de culture.....	37
Germination des spores.....	37
Cultures en milieu liquide.....	37

3.1.3 Variations endogènes du pouvoir germinatif des spores.	38
3.1.4 Essais de confrontation avec des plantes supérieures	38
3.1.4.1 <i>Pinus banksiana</i>	38
3.1.4.2 <i>Betula pendula</i>	38
3.1.4.3 Essais de confrontation	39
3.2 Etude électrophorétique du polymorphisme enzymatique	39
3.2.1 Extraction des protéines.....	39
3.2.2 Techniques électrophorétiques	40
3.2.2.1 Electrophorèse non dénaturante sur gel de polyacrylamide	40
Principe.....	40
Protocole	40
3.2.2.2 Electrophorèse sur gradipore.....	41
Principe.....	41
Protocole	41
3.2.3 Révélation des activités enzymatiques.....	42
3.3 Analyse du polymorphisme de l'ADN.....	42
3.3.1 Extraction de l'ADN total	42
3.3.2 Amplification enzymatique in vitro de l'ADN,	44
Principe.....	44
Conditions expérimentales	44
Mélange réactionnel.....	44
3.3.3 Analyse électrophorétique de l'ADN.....	46
3.3.4 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP).....	47
Principe.....	47
Conditions expérimentales	47
3.3.5 PCR aléatoire.....	48
3.3.6 Séquençage.....	49
3.4 Microscopie photonique	49
3.4.1 Fixation	50

3.4.2 Déshydratation.....	50
3.4.3 Inclusion	50
Préparation de la résine Epon (Luft, 1961).....	50
Inclusion	51
3.4.4 Sections semi-fines.....	51
<i>Première partie: Polymorphismes isoenzymatique et génomique.....</i>	52
Chapitre IV: Polymorphisme isoenzymatique.....	53
Chapitre V: Polymorphisme génomique	64
5.1 PCR des microsatellites et polymorphisme de l'ADN.....	65
5.2 Polymorphisme de la région ITS de l'ADN.....	75
<i>Deuxième Partie: Etudes expérimentales de la biologie des morilles</i>	111
Chapitre VI: Biologie de la morille	112
6.1 Variabilité du taux de germination des spores de morilles selon l'époque de l'année.....	113
6.2 La relation morille-arbre.....	113
6.2.1 Etude cytologique sur matériel de terrain	113
6.2.2 Cultures associées	115
Conclusion générale et perspectives.....	132
Références Bibliographiques.....	138
Annexes.....	155
Annexe 1: Isolats utilisés.....	156
Annexe 2: Gels d'amplification de la région ITS.....	162
Annexe 3: Gels de digestion de la région ITS.....	166
Annexe 4: Publication 7.....	170
Annexe 5: La surprise du chef.....	194

Avant-propos

La morille est un champignon qui suscite l'intérêt des hommes depuis fort longtemps. Les grecs et les romains la connaissaient sous les noms de *sponge*, *sfonduli*, *funguli* ou *spongioli*, et en appréciaient déjà la saveur délicate (Buller, 1915).

Aujourd'hui cet intérêt est demeuré intact et les morilles restent très recherchées.

Les morilles présentent une grande diversité de formes, difficiles à interpréter même pour les spécialistes, ce qui a engendré un grand nombre de classifications très différentes. Ces champignons présentent également des modes de vie très divers et variables, qui semblent fortement dépendre de conditions microécologiques.

Le but de ce travail était la mise au point d'un outil moléculaire qui puisse à la fois contribuer à clarifier la systématique ambiguë des morchellacées et permettre une approche plus précise de leur écologie.



Chapitre I: Introduction



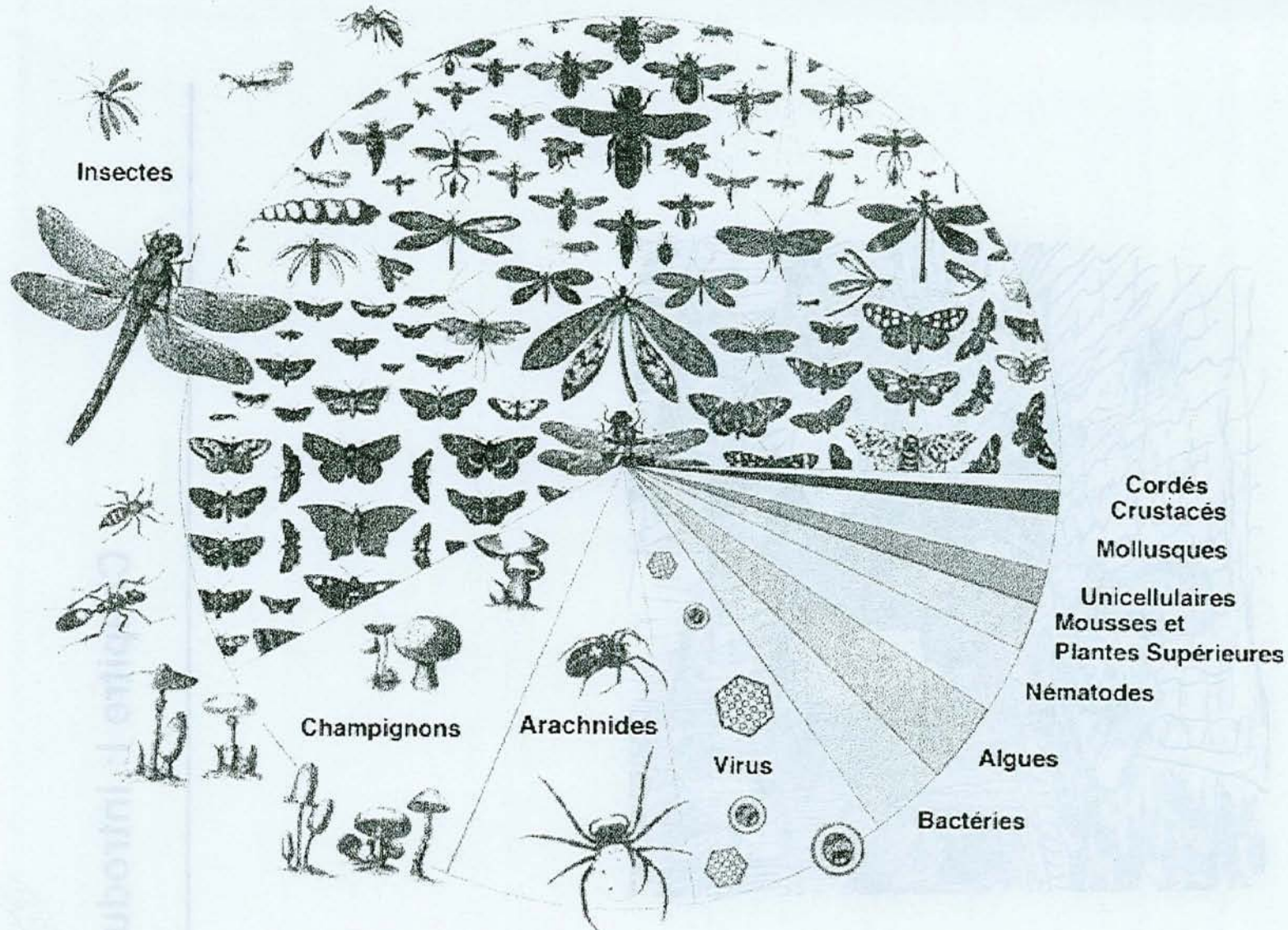


Figure 1 : Proportions relatives des grands groupes d'organismes vivants (d'après Shuh, 1995).

1.1 Les champignons et les autres organismes

Les champignons composent l'un des plus grands groupes d'organismes (Fig. 1) et il n'est pas d'aspect de la vie d'une forêt où ils ne jouent un rôle important. Les champignons sont des constituants normaux et indispensables de la biocénose (Jacquot, 1978): facteurs d'équilibre des peuplements, dont ils concourent à éliminer les arbres trop âgés ou déficients, facteurs essentiels dans la nutrition de toutes les plantes phanérogames. Dans la forêt aménagée, ils assurent la décomposition des souches et des rémanents d'exploitation, jouant ainsi le rôle de nettoyeur des coupes.

Les champignons apparaissent ainsi comme un facteur important du monde vivant et ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques. Ils présentent en outre un intérêt économique sans cesse croissant dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et chimiques.

Le fait capital qui conditionne très profondément l'écologie des champignons, est leur mode de nutrition. Incapables de photosynthèse, ils ne peuvent incorporer le carbone minéral et utilisent donc des matières organiques produites par d'autres groupes d'organismes. En fonction du mode de mobilisation du carbone organique on classe les champignons en trois groupes (Fig. 2 et 3) (Becker, 1953; Durrieu, 1993):

- 1° **Les Saprophytes**, se développent sur des organismes morts plus ou moins décomposés,
- 2° **Les Pathogènes**, se développent aux dépens d'autres organismes,
- 3° **Les Symbiotiques**, s'associent durablement à des organismes vivants en développant des structures morphologiques adaptées à un développement à bénéfices mutuels.

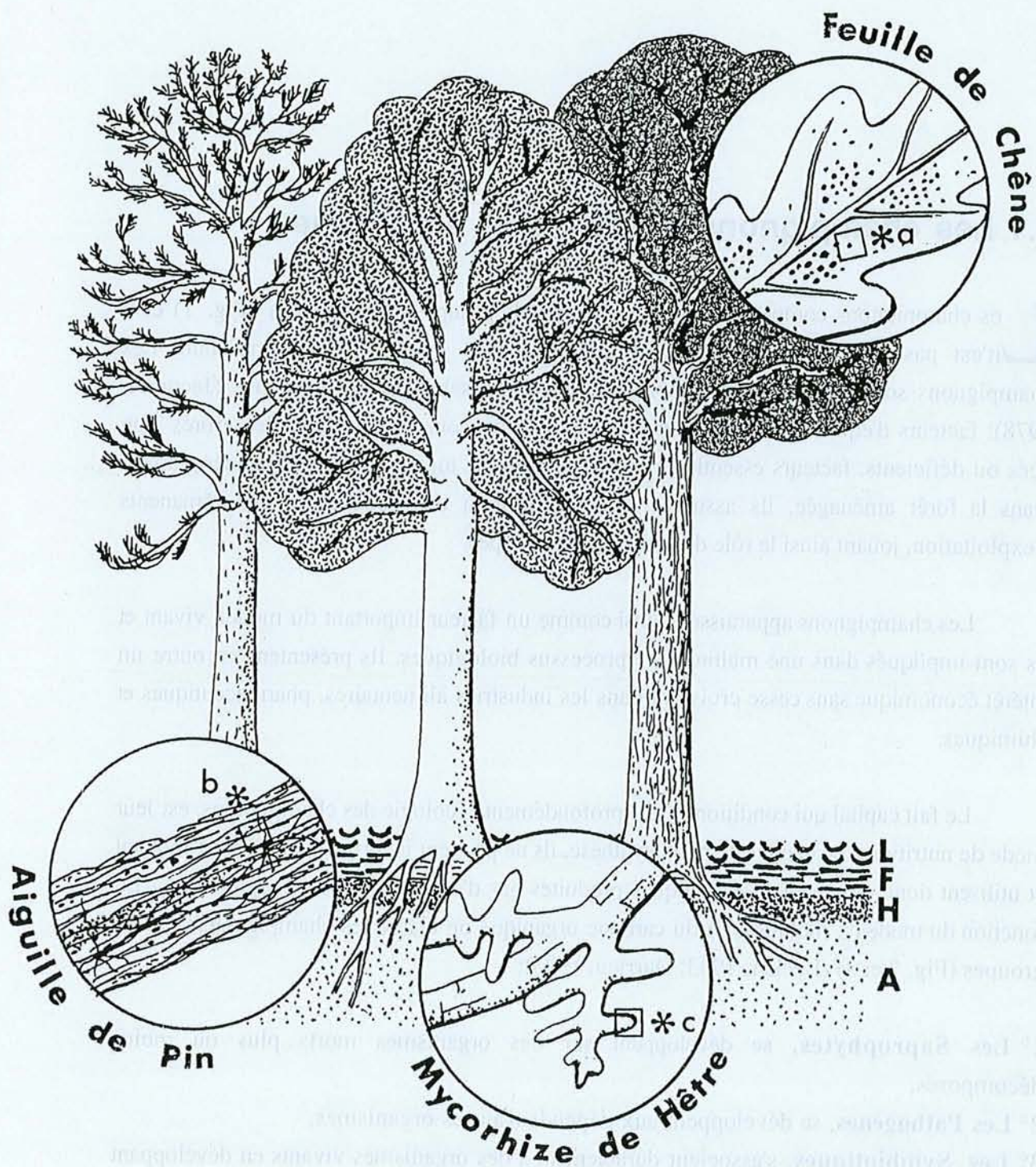


Figure 2 : Différents modes de vie des champignons. (a) Parasite du chêne; (b) saprophyte sur une aiguille de pin; (c) mycorhize de hêtre (d'après Strullu, 1989). Les trois cas sont illustrés dans la figure 3.

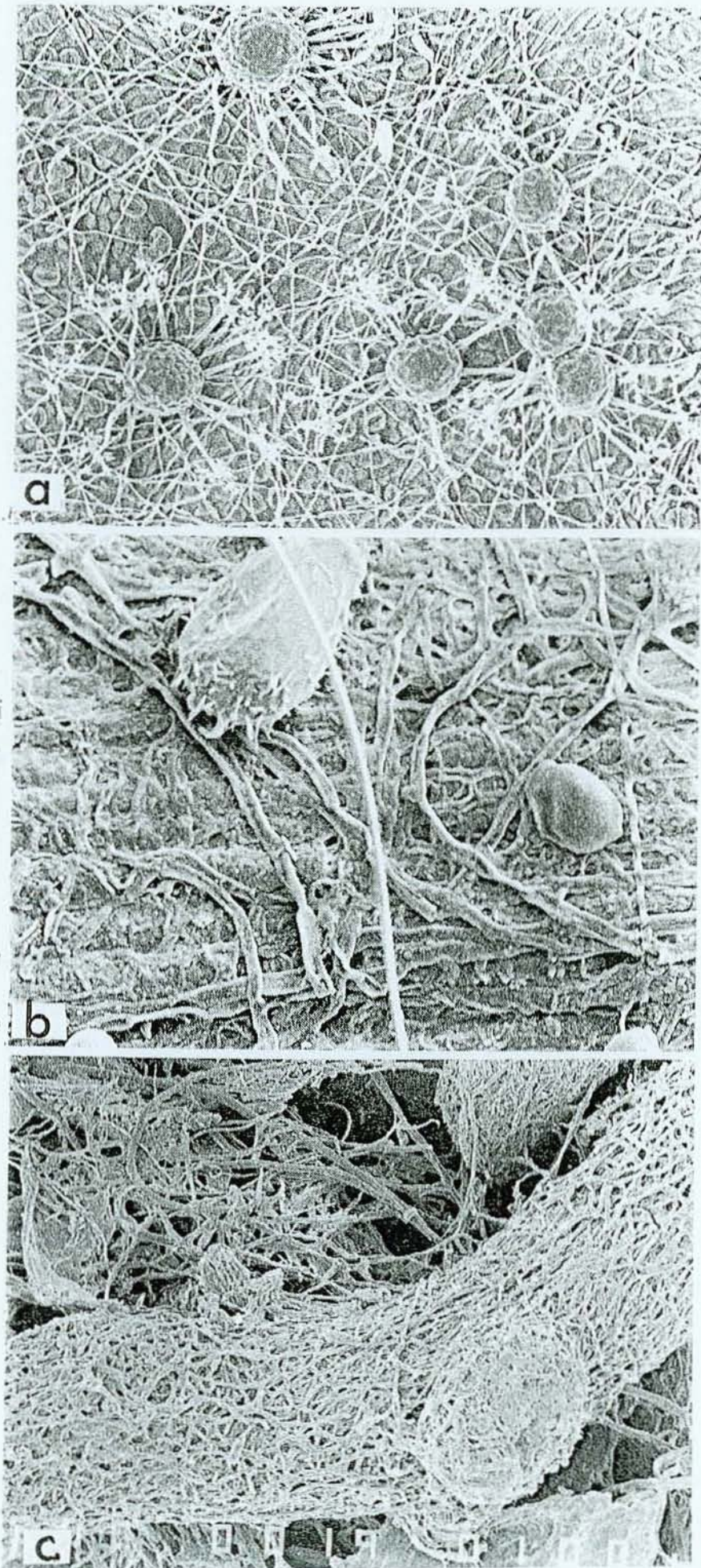


Figure 3 : Différents modes de vie des champignons. Observation en microscopie électronique à balayage. (a) Oïdium du chêne (*Microspheera*), les périthèces apparaissent à la face inférieure. (b) mycélium à la surface d'une feuille de pin, la perforation des parois cellulaires est due à des champignons cellulolytiques. (c) mycorrhize de hêtre.

Cette distinction possède cependant un caractère schématique, et il est parfois difficile de placer un champignon dans une catégorie définie. Ainsi *Botrytis cinerea* se comporte soit comme un saprophyte soit comme nécrotrophe (Durrieu, 1993). *Armillaria mellea* qui peut être purement saprophyte est le plus souvent nécrotrophe mais aussi parfois symbiote de certaines orchidées (Durrieu, 1993). *Tuber melanosporum* est mycorhizien avec certaines essences d'arbres, mais parasite des graminées (Plattner et Hall, 1995). Certains ascomycètes commencent leur développement comme parasites sur des feuilles vivantes et le terminent en saprophytes sur ces mêmes feuilles après leur chute.

Il convient donc d'examiner plus en détail le mode de nutrition des champignons si l'on veut mieux appréhender la complexité de leur écologie.

1.1.1 Les saprophytes des débris végétaux

Les saprophytes sont polyphages ou spécialisés d'une façon plus ou moins étroite. Ils sont inféodés à un substrat autant pour sa composition que pour les conditions écophysologiques, en particulier physiques, chimiques et microclimatiques qu'il fournit.

On conçoit donc que l'étendue de l'aire de dispersion d'un saprophyte dépende à la fois de son degré de spécialisation et de la distribution de son ou ses substrats. Ainsi *Marasmius buxi* qui est strictement inféodé à la litière des feuilles de buis a une aire de distribution qui correspond exactement à l'aire de cet arbuste.

En fonction de la nature de leur substrat on distinguait autrefois sept grands groupes de saprophytes (Becker, 1953).

- 1° **Fumicoles** (fumier chaud et en fermentation, ou bouses en été) et **Coprophiles** (excréments),
- 2° **Humicoles** (humus *sensu stricto*),
- 3° **Lignicoles** (bois mort plus ou moins décomposé),
- 4° **Terricoles** (terre nue),
- 5° **Practicoles** (prairies),
- 6° **Follicoles** (feuilles),
- 7° **Divers** (milieux spéciaux, souvent inattendus).

Les classifications modernes se réfèrent à la nature biochimique des substances mises en décomposition par les champignons. Ces substances peuvent alors être classées en trois catégories principales (Durrieu, 1993):

- les glucides de faible poids moléculaire ou facilement hydrolysables (sucres, amidon, pectines...),

- les glucides à longues chaînes moléculaires (cellulose -constituant l'essentiel des parois cellulaires, où elle se présente sous forme de fibrilles orientées- et hémicelluloses -qui enveloppent les fibrilles d'une matière amorphe),
- les complexes macromoléculaires à noyaux phénoliques (lignines).

1.1.1.1 Les champignons des glucides solubles ou faciles à hydrolyser

Ce sont essentiellement les "sugar fungi" (Garrett, 1959), encore appelés champignons des sucres, ou "primary moulds" (Frankland *et al.*, 1982), ou moisissures pionnières. Ils colonisent très rapidement les organes végétaux fraîchement tombés où ils trouvent des sources de carbone immédiatement consommables. Pour certaines espèces ce type de colonisation est facile car ils préexistent à la surface des organes vivants où ils se nourrissent d'exsudats à travers l'épiderme. Ce sont des champignons mycéliens à croissance et sporulation rapides tels que les mucorales, ou encore des levures. Ces dernières jouent un rôle important dans la décomposition des fruits charnus. *Saccharomyces cerevisiae* a été domestiqué pour la fabrication des boissons fermentées: vin, cidre...

1.1.1.2 Les champignons cellulolytiques

Ces champignons possèdent des enzymes capables de couper les chaînes de cellulose et d'hémicellulose afin d'en extraire les molécules simples telles que le glucose. On retrouve le plus souvent ces champignons dans les horizons supérieures du sol (litière). Ce sont des mucorales ou des hyphomycètes tels *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium* (Rosenbrock *et al.*, 1995).

Des champignons cellulolytiques spécialisés s'attaquent également à la fraction cellulosique du bois, certaines espèces étant même incapables de dégrader la lignine (Lindeberg, 1947.; Mikola, 1956; Hering, 1967). Ils provoquent deux types de décomposition: la pourriture rouge ou cubique pour les bois exposés à l'air et la pourriture molle pour ceux qui sont fortement imprégnés d'humidité.

Dans le cas de la pourriture rouge, les champignons utilisant essentiellement la cellulose et l'hémicellulose, la proportion relative de lignine augmente. La coloration vire alors au brun ou au brun rouge. La diminution de volume s'accompagne de fentes de rétractions, qui font que le bois se débite en petits cubes. Les agents fongiques de ces pourritures sont principalement des basidiomycètes, et surtout des polypores.

Les pourritures molles sont plus rares. Les champignons qui les provoquent ne se développent que sur des substrats saturés d'humidité; on ne les rencontre donc que sur des bois soumis à un ruissellement abondant, ou même immergés. Les filaments mycéliens s'attaquent ici à la paroi secondaire des cellules, la détruisant entièrement. Le bois perd alors

sa structure rigide et prend une coloration foncée. Les agents de ces pourritures sont surtout des ascomycètes ou des champignons imparfaits.

1.1.1.3 Les champignons ligninolytiques

Les dégradeurs de la lignine possèdent un potentiel catabolique remarquable. Ils exsudent des oxydases et peroxydases capables de décomposer de manière non spécifique la multitude d'arrangements de noyaux aromatiques qui constituent le bois. Cette efficacité et la non spécificité de ces exoenzymes font de ces champignons un matériel de choix pour la dégradation de substances xénobiotiques toxiques comme les pesticides aromatiques polychlorés ou les dioxines (Rosenbrock *et al.*, 1997). Dans la nature ces champignons s'attaquent aussi bien à la fraction ligneuse contenue dans l'humus qu'à la lignine du bois.

Le mode de vie des champignons lignolytiques est difficile à classer, car si le bois est un tissu essentiellement mort, il assure un rôle fondamental dans les arbres vivants.

1.1.2 La symbiose avec les organismes chlorophylliens

Les relations entre champignons et organismes chlorophylliens existent sous deux grandes formes, les lichens et les mycorhizes.

1.1.2.1 Les Lichens

Le terme de symbiose a été introduit par le mycologue allemand Heinrich Anton De Bary en 1879 (cité par Ahmadjian, 1982) pour décrire l'association d'un champignon et d'une algue chez les lichens. L'intégration morphologique et fonctionnelle entre les algues et les champignons est si étroite, que la nature symbiotique des lichens n'a été définitivement démontrée que dans la deuxième moitié du siècle dernier, Gaston Bonnier en apportant la preuve expérimentale en 1889 en réalisant la synthèse d'un lichen à partir d'une spore et d'une algue (Durrieu, 1993).

Le partenaire chlorophyllien est aussi fréquemment appelé partenaire algal ou phycobionte. Il s'agit d'algues ou des cyanophycées (procaryotes dépourvus de véritable noyau cellulaire) qui sont des bactéries. Les cyanophycées lichéniques appartiennent majoritairement au genre *Nostoc*. Quand il s'agit d'algues véritables les phycobiontes sont exclusivement des chlorophycées. Le genre le plus répandu étant *Trebouxia*. Si les phycobiontes des lichens peuvent avoir une vie autonome ils sont incapables de reproduction sexuée dans la phase symbiotique.

21. B. Frank: Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze.

(Mit Tafel X.)

Eingegangen am 17. April 1885.

Se. Excellenz der Herr Minister für Landwirthschaft, Domänen und Forsten hat, um die Zucht der Trüffel im Königreiche Preussen nach Möglichkeit zu fördern, mich beauftragt zunächst durch wissenschaftliche Untersuchungen über die Bedingungen des Vorkommens und der Entwicklung dieser Pilze der Angelegenheit planmässig näher zu treten. Gewisse durch Beobachtung und Erfahrung schon festgestellte Thatsachen, wie das stete Zusammenvorkommen der echten Trüffeln mit lebenden Bäumen, die namentlich auch bei den bis jetzt vorgenommenen Erhebungen in den preussischen Trüffelgegenden hervorgetretene Beziehung des Trüffelvorkommens zu bestimmten Baumarten, nämlich Buche, Hainbuche und Eiche, vor allen Dingen auch die von Reess¹⁾ erkannte an Parasitismus erinnernde Verbindung des Myceliums von *Elaphomyces* mit den Kiefernwurzeln, richten die Untersuchungen von vornherein auf die Frage, ob auch bei den echten Trüffeln ein Zusammenhang des Myceliums mit lebenden Baumwurzeln besteht. Wie die folgenden Mittheilungen zeigen werden, muss diese Frage aber noch viel weiter ausholen, weil sie die Kenntniss von Dingen hinsichtlich der Natur und der Ernährung der Pflanzen voraussetzt, von welchen die Wissenschaft bis jetzt keine Ahnung gehabt hat. Von diesen soll in meiner heutigen Mittheilung zunächst allein nur die Rede sein. Es betrifft die Thatsache, dass gewisse Baumarten, vor allen die Cupuliferen ganz regelmässig sich im Boden nicht selbst

ständig ernähren, sondern überall in ihrem gesammten Wurzelsystem mit einem Pilzmycelium in Symbiose stehen, welches ihnen Ammendienste leistet und die ganze Ernährung des Baumes aus dem Boden übernimmt. So überraschend dieser Satz klingen mag, so ist er durch die Ausdehnung meiner Untersuchungen schon jetzt als festbegründet zu betrachten.

Wenn man von irgend einer unserer einheimischen Eichen, Buche, Hainbuche, Hasel oder Kastanie die im Boden gewachsenen Saugwurzeln, welche die letzten Verzweigungen des Wurzelsystems sind und die eigentlich nahrungsaufnehmenden Organe darstellen, untersucht, so erweisen sie sich allgemein aus zweierlei heterogenen Elementen aufgebaut: aus einem Kern, welcher die eigentliche Baumwurzel repräsentirt, und aus einer mit jenem organisch verwachsenen Rinde, welche aus Pilzhyphen zusammengesetzt ist. Dieser Pilzmantel hüllt die Wurzel vollständig ein, auch den Vegetationspunkt derselben lückenlos überziehend, er wächst mit der Wurzel an der Spitze weiter und verhält sich in jeder Beziehung wie ein zur Wurzel gehöriges mit dieser organisch verbundenes peripherisches Gewebe. Der ganze Körper ist also weder Baumwurzel noch Pilz allein, sondern ähnlich wie der Thallus der Flechten, eine Vereinigung zweier verschiedener Wesen zu einem einheitlichen morphologischen Organ, welches vielleicht passend als Pilzwurzel, *Mycorrhiza* bezeichnet werden kann.

1. Bau der *Mycorrhiza*. In der Oberflächenansicht gleicht die Pilzwurzel im feineren Baue den meisten Pilzsclerotien; sie zeigt ein aus regellos und sehr dicht verschlungenen Hyphen gebildetes Pseudoparenchym, dessen Zellen in ihrer Grösse je nach dem Quer- oder Längendurchmesser etwa zwischen 0,0024–0,01 mm schwanken (Taf. X, Fig. 3). Die Membranen sind relativ dünnwandig, bald fast farblos, bald hell- oder dunkelbraun, wonach die *Mycorrhiza* hell oder bräunlich oder fast schwarz aussieht. Das Pseudoparenchym ist seltener einschichtig, häufiger mehrschichtig und bildet darum oft, wie aus Quer- oder Längsschnitten ersichtlich, einen ziemlich dicken Mantel. Dieser liegt der Wurzelepidermis nicht bloss innig auf, sondern von ihm aus

Le partenaire fongique est dans la majeure partie des cas un ascomycète (disco- ou pyrénomycète). A la différence des algues, les champignons lichénisants ne sont pas connus à l'état libre et effectuent tout leur cycle biologique à l'état lichénique. Il existe aussi des Basidiolichens à répartition tropicale, mais ils sont peu nombreux.

Les lichens sont écologiquement importants. Ce sont des "végétaux" pionniers pour la colonisation de milieux extrêmes. De plus, il y a plus d'un siècle que les lichénologues ont noté la raréfaction des lichens en ville. Cette grande sensibilité est due à leur remarquable capacité à accumuler les ions minéraux toxiques contenues dans l'atmosphère. Ceux-ci bloquent la photosynthèse. Il s'en suit une décoloration et le détachement du support, consécutif à la dénaturation des acides lichéniques. Cette sensibilité des lichens à la pollution est très variable selon les espèces, on dispose ainsi de bons bio-indicateurs permettant de cartographier très précisément la pollution atmosphérique.

1.1.2.2 Les Mycorhizes

C'est dès 1832, que Fries a reconnu la nature fongique des couches cellulaires externes des racines de *Monotropa*; il a d'ailleurs appelé le champignon associé *Tubercinia monotropa*. En 1877 Pfeffer (cité par Durrieu, 1993) a supposé le premier que les champignons associés aux racines de différents arbres servaient de convoyeurs de substances de l'humus vers la plante-hôte (Boullard, 1968). Mais la notion de mycorhize proprement dite n'a été développée par Franck qu'en 1885 (Fig. 4). Il a décrit un concept structural représentant une racine associée à un champignon symbiotique. En France, dès 1887, Lecomte a confirmé l'opinion de Franck en écrivant: «j'ai trouvé souvent le *mycorhiza* sur des racines de divers arbres et en particulier celles du hêtre, du châtaignier, du chêne et du noisetier dans la région montagneuse du département des Vosges».

Bien que le rôle principal des mycorhizes soit nutritionnel, des effets non nutritionnels tels que la protection vis-à-vis des pathogènes du sol sont également observés (Trappe, 1977; Sinclair *et al.*, 1982; Chalot *et al.*, 1988). D'autres mécanismes plus spécifiques sont mis en jeu dans certains types de mycorhizes.

La mycorhization est un phénomène très répandu chez les plantes vasculaires, et constitue un élément capital de la biosphère. Il existe différents types de mycorhizes que l'on distingue principalement selon des critères morphologiques: ecto-, endo- et ectendomycorhizes (Fig. 5). Les endomycorhizes sont observées sur environ 90% des plantes vasculaires, contre 10% pour les ectomycorhizes (Henrion, 1993). Les ectendomycorhizes représentent un pourcentage infime.

Les Ectomycorhizes

Chez les ectomycorhizes les radicelles sont entourées d'une gaine fongique, le manteau, plus ou moins épaisse et dense. De ce manteau partent des filaments mycéliens qui forment un réseau extramatriciel dans le sol. Le plus souvent, le manteau enveloppe complètement l'apex racinaire et peut représenter jusqu'à 40% du poids sec de la mycorhize. Sous le manteau des hyphes progressent entre les cellules des tissus corticaux sans pénétration intracellulaire (Harley et Smith, 1983 ; Kottke et Oberwinkler, 1986). Cette structure est appelée le réseau de Hartig, du nom du premier mycologue qui l'a décrit.

Les végétaux ectomycorhiziens sont le plus souvent des espèces ligneuses. Les partenaires fongiques sont surtout des basidiomycètes, mais aussi de nombreux ascomycètes, à carpophores épigés ou hypogés (Durrieu, 1993).

Les Ectendomycorhizes

Chez les ectendomycorhizes le mycélium du réseau de Hartig émet des ramifications qui pénètrent et se développent dans les cellules du parenchyme cortical. Ces mycorhizes ne concernent qu'un petit nombre d'espèces végétales. Elles existent de façon inconstante chez certains pins qui sont normalement ectomycorhiziens (Mikola, 1956). Au sein de la famille des Ericoïdes, la sous-famille des Arbutoïdées forme des ectendomycorhizes chez lesquelles le développement intracellulaire des hyphes est remarquable (Münzenberger, 1991).

Il faut noter le cas particulier du «suce-pin», *Monotropa hypopitys*, qui est une plante dépourvue de chlorophylle et essentiellement composée d'un appareil racinaire. Un système touffu et ramifié d'hyphes entoure cet appareil et forme un réseau de Hartig limité aux assises corticales les plus externes. Ce mycélium forme également de courtes digitations coniques intracellulaires qui sont très différentes des pelotons observés chez les autres types d'ectendomycorhizes. Cette association appelée **mycorhize monotropoïde** présente la particularité que c'est le champignon qui alimente la plante en sucres.

De par leur nombreuses ressemblances avec les ectomycorhizes on suppose que les champignons impliqués dans les ectendomycorhizes appartiennent aux mêmes groupes que ceux rencontrés dans les ectomycorhizes.

Les Endomycorhizes

A la différence des ectomycorhizes les endomycorhizes ne présentent pas d'aspect externe particulier. Seules les endomycorhizes en «collier de perles» sont facilement détectables en observant des racines. Elles sont formées d'une succession de zones renflées

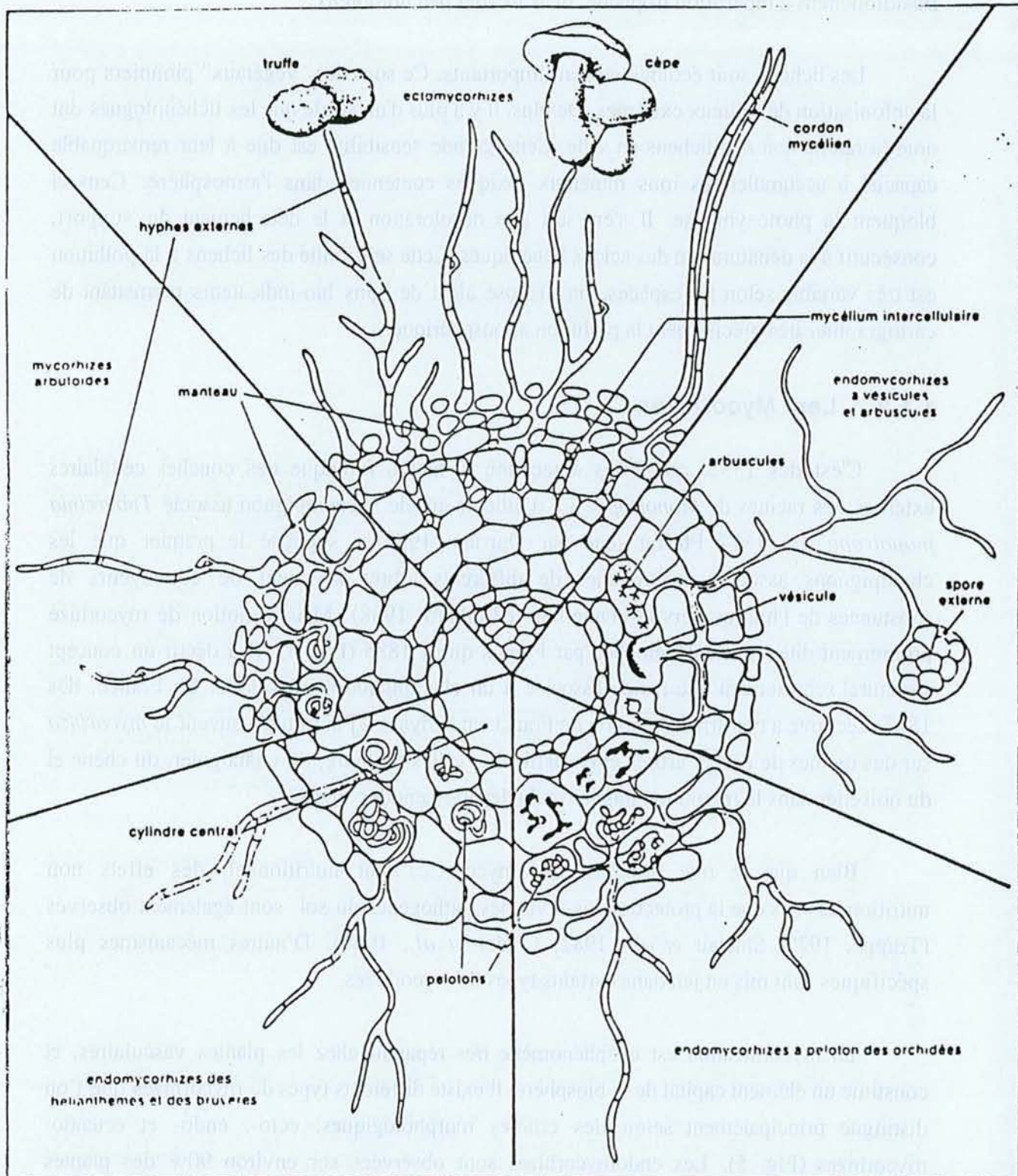


Figure 5 : Représentation schématique des différents types de Mycorhizes (D'après Le Tacon, 1985).

(parties où le champignon est présent) et d'étranglements. On les observe particulièrement chez les érables.

On distingue trois grands types d'endomycorhizes:

Les **endomycorhizes éricoïdes** et les **endomycorhizes d'orchidées** sont toutes deux formées par des champignons à hyphes cloisonnés (asco- et basidiomycètes) qui développent des pelotons mycéliens intracellulaires. Ce type d'association est réalisé respectivement par les éricacées (plus petites familles voisines) et les orchidées.

Les **endomycorhizes à arbuscules** ont pour partenaire fongique des endogonacées à hyphes siphonnées. Le mycélium forme des vésicules renflées (vésicules) ou fortement ramifiées (arbuscules).

Les Endomycorhizes éricoïdes

Les éricacées possèdent des racines filiformes constituées d'un petit cylindre central avec un seul pôle ligneux, un endoderme et une assise unique de cellules corticales. De ces racines part un chevelu mycélien lâche qui diffuse directement dans le sol sans constituer de manchon autour de la racine. Ce type de mycorhizes se rencontre chez la majorité des éricacées, sauf chez les arbutoides où il semble exceptionnel. En ce qui concerne le partenaire fongique, des auteurs ont isolé des «slow growing dark fungi». Pearson et Read (1973) ont montré leur absence de spécificité vis-à-vis de diverses éricacées. Read a obtenu en 1974 des fructifications d'un petit Ascomycète qu'il a baptisé *Pezizella ericae*. Ce champignon a ensuite été isolé à partir de différentes éricacées et classifié dans le genre *Hymenoscyphus*. Cependant la présence de basidiomycètes dans les racines d'éricacées a souvent été signalée. Ils ont été mis en évidence, soit par l'observation de dolipores dans les hyphes, soit par des techniques immunologiques. La mycorhization chez les éricacées n'est pas systémique.

Les Endomycorhizes des orchidées

Les orchidées constituent l'une des familles de plantes les plus riches, puisque l'on dénombre près de 30000 espèces, tropicales pour leur majorité. Toutes les orchidées sont mycorhiziennes, et de plus un partenaire fongique est indispensable à la germination. Le champignon envahit à la fois les protocormes de germination et le système racinaire des plantes adultes. Les deux types d'association ont été caractérisés par Bernard en 1909. Chez les protocormes, le champignon stimule la multiplication des cellules et permet le développement embryonnaire. Ce premier mycobionte n'assure pas la mycorhization des racines de la plante adulte. Celle-ci se produit à partir de mycélium présent dans le sol. Seul le parenchyme cortical de la périphérie des racines présente des pelotons d'hyphes actives. Dans la partie plus interne du parenchyme, les cellules présentent des amas résiduels

d'hyphes digérés. On a très tôt isolé les partenaires fongiques des orchidées qui sont des basidiomycètes capables de croître sur milieu artificiel. Les formes imparfaites tout d'abord obtenues ont été attribuées au genre *Rhizoctonia*. L'obtention de stades parfaits a montré que ces champignons sont principalement des Tulasnellales, connus comme étant saprophytes ou parasites lignocellulotiques. Warcup en 1981 a testé 65 espèces lignicoles, sept d'entre elles, ont eu un effet favorable sur la germination d'une orchidée australienne chlorophyllienne, *Galeola foliata*. La spécificité des relations orchidées-champignons symbiotiques n'est pas étroite. De nombreuses orchidées s'associent à des genres fongiques différents, par exemple *Calypso bulbosa* est mycorhizé par *Rhizoctonia*, *Thanatephorus*, *Leptodontium* et *Phialocephala* (Currah *et al.*, 1988).

Les Endomycorhizes à arbuscules

Les endomycorhizes à arbuscules sont répandues dans la nature. Si elles sont formées par une diversité d'espèces végétales, le symbiote fongique appartient toujours à la famille des endogonacées. Ce type de mycorhize a été décrit en 1904 par Gallaud. Seule l'observation microscopique permet d'identifier formellement les endomycorhizes à arbuscules. L'aspect des racines colonisées diffère peu des racines nues. L'infection se produit à partir de spores ou de fragments de mycorhizes. Les points de pénétration sont situés en arrière de la zone d'élongation racinaire. Au contact des cellules racinaires se forme un *appressorium*. Les hyphes progressent ensuite de cellule en cellule, où le champignon forme des arbuscules, ainsi que dans les méats. L'infection engendre une hypertrophie cellulaire et une diminution du nombre et de la taille des grains d'amidon dans les amyloplastés. Le mycélium intercellulaire colonise le système racinaire sur une longueur importante. Il est à l'origine des vésicules, formations globuleuses de grande taille, multinucléées riches en lipides et en calcium. Les symbiotes fongiques impliqués dans les endomycorhizes à arbuscules ont été très tôt reconnu comme étant des endogonacées (Peyronel, 1923). De nos jours quatre genres distincts sont reconnus parmi les endomycorhiziens à arbuscules: *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* et *Sclerocystis* (Harley et Smith, 1983).

1.1.2.3 Les endophytes

Les endophytes sont des champignons qui, à l'opposé des mycorhiziens, établissent une symbiose avec les parties aériennes des végétaux en se localisant entre les cellules foliaires. Ce sont principalement des ascomycètes ou des deuteromycètes (Petrini, 1986). La plante apporte au champignon des sucres et lui assure une facilité de dissémination dans la mesure où celui-ci infecte les graines. En échange les endophytes assurent à la plante et à ses semences une protection face aux herbivores et insectes par le biais de la production

d'alcaloïdes très toxiques (Clay, 1991). La découverte des endophytes est récente et il s'avère que ce type d'association, à la nature souvent mal définie, est probablement aussi général que la symbiose mycorrhizienne.

1.1.3 Les champignons parasites des végétaux

Les champignons parasites des végétaux sont beaucoup plus nombreux que les parasites des animaux et de l'homme. Ce vaste groupe comprend des espèces biotrophes et nécrotrophes qui diffèrent grandement dans leur écologie et leur physiologie. Chez les parasites biotrophes au premier rang desquels il faut citer les Uridénales (agents de rouilles), les Ustilaginales (agents des charbons), les Erysiphacées (agents des oïdiums) et les Péronosporacées (agent des mildious), le parasitisme semble être indispensable au champignon. Il est pratiquement impossible de maintenir ces champignons en culture en l'absence de leurs tissus cibles. De plus, les espèces sont souvent inféodées à un spectre très étroit de plantes hôtes avec lesquelles elles semblent avoir coévolué. Chez les parasites nécrotrophes la spécificité vis-à-vis d'une plante est variable. Ainsi, les armillaires peuvent elles s'attaquer à un spectre étendu d'espèces d'arbres, alors que *Piptoporus betulinus* attaque strictement le genre *Betula*. Il faut également rappeler ici que nombre d'espèces de champignons pathogènes peuvent être saprophytes voire symbiotiques dans d'autres conditions.

Devant cette multiplicité et diversité on conçoit que les mécanismes régulateurs du parasitisme fongique soient encore très mal compris. Si l'existence de gènes spécifiques de pathogénicité est possible, on peut aussi invoquer une simple différence de régulation génétique (Boiron, 1995). Il faut cependant noter que dans les groupes de champignons comprenant des espèces pathogènes, il s'agit là d'un caractère d'évolution convergente dont le mode d'acquisition a pu différer chez un ensemble aussi polyphylétique que les champignons.

1.1.4 Animaux et champignons

Les interactions entre animaux et champignons sont nombreuses. On les regroupe en quatre grandes catégories:

1. La mycophagie avec dispersion des spores
2. La mycophagie symbiotique
3. Le saprophytisme fongique de déchets animaux
4. Le parasitisme et la prédation

La mycophagie avec dispersion des spores

Les rongeurs, écureuils, mulots ou campagnols se nourrissent de carpophores sur lesquels ils laissent souvent des traces de morsures. Les carpophores sont également souvent colonisés par des collemboles, des coléoptères et des diptères (*mycetophilidae*). Une mouche bien connue des amateurs de champignons, est *Helomyza* (ou mouche de la truffe), qui recherche les truffes pour y pondre. Son vol au dessus des fructifications est d'ailleurs utilisé par certains récolteurs de truffes. Les insectes adultes peuvent contribuer à la dispersion des spores des carpophores hypogés où leurs larves se sont développées. Les vers de terre ou les petits rongeurs participent également à la dispersion des champignons. En effet, des fragments de carpophores sont avalés et digérés, mais les spores survivent à la digestion qui dans certains est indispensable à leur germination (Durieu, 1993). Certains herbivores tels que sangliers et cerfs dispersent ainsi des spores sur des distances plus considérables.

La mycophagie symbiotique

Schmidberger a découvert en 1836 que les galeries du coléoptère *Xyleborus dispar*, étaient tapissées d'un fin "duvet" blanc dont l'insecte se nourrit (Durieu, 1993). Ce "duvet" était en fait édifié par un champignon qui se développe aux dépens du bois. On a constaté qu'il est nécessaire pour la survie des jeunes larves qu'elles trouvent cette nourriture à leur naissance. La dispersion du champignon est en contre partie assurée par les femelles qui possèdent des organes spécialisés, les «mycétanges» dans lesquels se trouvent des éléments mycéliens. Il existe différents modes d'association de ce type entre des champignons et des insectes, plus ou moins élaborés.

Un cas remarquable est la domestication de champignons par les fourmis sud-américaines du genre *Atta*. Celles-ci découpent des rondelles de feuilles ou de pétales qu'elles ramènent à leur nid, puis les mâchent pour obtenir une pâte qui sert à édifier des meulesensemencées par du mycélium (Weber, 1979). Le mycélium croit activement sur ce milieu soigneusement entretenu et protégé par les fourmis, qui parviennent à maintenir une culture fongique monospécifique.

D'autres animaux tels que les ruminants hébergent dans leur tube digestif des champignons auxiliaires indispensables à la digestion des plantes ingérées (Durieu, 1993).

Saprophytisme fongique de déchets animaux

Il existe des champignons saprophytes spécialistes de certains restes animaux, telles les espèces keratinophiles qui métabolisent la corne, les poils ou les plumes tombés sur le sol. Ce sont en particulier des ascomycètes ou leur forme conidienne. Des champignons

appartenant à des groupes très différents sont coprophiles et constituent une flore fongique exclusive des excréments.

Le parasitisme et la prédation

Les animaux subissent des attaques parasitaires fongiques qui provoquent des affections plus ou moins virulentes sous le terme de mycoses. Les champignons de l'ordre des entomophales s'attaquent de façon drastique au système nerveux des insectes, dont ils régulent ainsi les populations. Les mycoses des vertébrés et de l'homme s'attaquent superficiellement à l'épiderme et aux muqueuses, elles n'ont d'effets drastiques que chez les sujets immunodéficients.

Au titre des champignons prédateurs on peut citer les myxomycètes dont les plasmodes phagocytent des bactéries. Pour leur part les prédateurs des nématodes peuvent produire un réseau mycélien sécrétant une substance adhésive qui piège leurs proies; le mycélium perce les téguments, envahit tout le corps et digère les organes en quelques heures. Dans d'autres cas, le champignon produit des «collets» mycéliens actifs ou passifs. Dans les collets passifs le nématode essaie de forcer le passage, mais finit par être bloqué en raison de l'élasticité du mycélium. Les collets actifs, stimulés mécaniquement par le passage d'un nématode, se gonflent et capturent l'animal qui est lysé par des protéases.

1.1.5 Champignons et champignons

Les interactions entre champignons sont multiples. Les relations commensales existent, mais il faut aussi citer les cas d'antagonisme et de parasitisme. L'antagonisme peut être intraspécifique (par exemple *Collybia platyphylla*). Certaines espèces de genres saprophytes comme *Trichoderma sp.* peuvent aussi s'attaquer à d'autres espèces fongiques dont elles entourent les hyphes avant d'inhiber leur croissance grâce à des antibiotiques, puis d'en digérer le contenu cellulaire (Dennis et Webster, 1971).

Il existe également des cas de mycoparasitisme (Jeffries, 1995) où l'espèce agressive est souvent du même groupe systématique que l'espèce cible. C'est le cas du parasitisme de *Rozella allomycis* sur *Cladochytrium* . Ce type de parasitisme se rencontre principalement dans des groupes peu évolués.

1.2 La morille

1.2.1 Classification

Les morilles, facilement reconnaissables à leur hyménium alvéolé, font partie des ascomycètes (spores contenues dans des asques) et plus précisément des discomycètes, qui se distinguent par une fructification généralement en forme de coupe plus ou moins pédicellée nommée apothécie. Le genre *Morchella* est facile à identifier (Chadefaud, 1960) :

Spores méiotiques formées dans un asque	Embranchement des Ascomycètes
Surface fertile discoïde à hyménium typique	Classe des Discomycètes
Asques annélacés et operculés	Ordre des Pezizales
Apothécies stipitées, spores lisses	Groupe des Pezizales Archaïques
Spores elliptiques à guttules externes	Famille des Morchellacées
Apothécies stipitées cupulées	Genre <i>Disciotis</i>
Apothécies stipitées mitrées +:	
- Tête lisse	Genre <i>Verpa</i>
- Tête alvéolée +:	
- Vallécule supérieure à la moitié de la tête	Genre <i>Mitrophora</i>
- Vallécule réduite ou absente	Genre <i>Morchella</i>

Les espèces du genre *Morchella* sont beaucoup plus difficiles à discerner. En effet, au sein des Morchellacées, la forme des asques, à l'image des autres critères microscopiques, est remarquablement homogène. Dès lors, les nombreuses classifications proposées depuis le travail de Boudier (1897) (Fig. 6), sont essentiellement basées sur des critères macromorphologiques et écologiques difficiles à interpréter, et à ce titre, elles sont très diverses.

1.2.1.1 Classification selon Boudier (1897-1907)

Les morilles sont classées en deux genres (Fig. 6):

- le genre *Morchella* Dill. présente un réceptacle ou chapeau, dont la base est adhérente au pied (morilles adnées) ou possède une partie libre peu développée, la vallécule (morilles distantes). Ce critère permet de séparer le genre *Morchella* en deux sections:

MORCHET. LA Dill. Toutes spores sont elliptiques (sauf chez *M. Finotii*); le chapeau n'a pas de partie libre à sa base.

SECTION I. Adnotæ. Pas de valécule au haut du pied.

- Champignon variant de 3 à 7 cm. de haut.
 - Chapeau presque noir, arrondi, plus grand que le pied; côtes ferrugineuses peu sinuées; alvéoles petits, assez réguliers, subarrondis. Pied blanc, glabre, peu robuste, un renflé en bas. Paraphyses colorées, non épaissies au sommet; spores 18-23 μ \times 9-12 μ . Taille 3 à 7 cm. 7. *M. umbrina* Boud. Pl. 201, texte 162. (En troupe.)
 - Chapeau crème olivâtre, oblong, côtes vert olivâtre, subappendiculées; alvéoles allongés, sinués, crème olivâtre. Pied blanc-crème, floconneux. Spores hyalines, 22-24 μ de long. Taille 6 à 9 cm. 9. *M. olivæ* Quél. (Prairies calcaires.)
 - Chapeau fauve grisâtre, plus ou moins pâle, subarrondi; côtes ferrugineuses ou ochracé pâle, très sinuées, rarement appendiculées; alvéoles nombreux, très irréguliers, petits, plus ou moins contournés. Pied blanc un peu ochracé, presque lisse, robuste, un peu épaissi en bas. Spores 20-25 μ \times 12-13 μ . Taille 3 à 7 cm. 6. *M. spongiosa* Boud. Pl. 200, texte 158. (Très précoce.)
 - Chapeau fauve jaunâtre. Pied brun. Taille 3-6 cm. 8. *M. heteri* Boud. Pl. 197, texte 150.
 - Chapeau fauve, ovale ou conique, bien adhé au pied; côtes flexueuses, rarement appendiculées; alvéoles profonds, grands, un peu irréguliers, plissés intérieurement. Pied fauve pâle, très grossièrement furfuracé, irrégulièrement sillonné, à base non épaissi. Paraphyses grêles, à peine épaissies au sommet; spores 20-25 μ \times 13-15 μ . Taille 6-7 cm. 10. *M. rudis* Boud. Pl. 203, texte 167. (Espèce rare.)
- +4 Champignon de 7 à 37 cm. de haut.
 - Chapeau noirâtre, ovale ou oblong, rarement arrondi; côtes épaisses, plus pâles, souvent ferrugineuses, appendicées sur le côté; alvéoles très irréguliers, souvent confluent plus ou moins serrés ou cérébriformes. Pied blanchâtre, presque glabre, renflé et sillonné à la base. Paraphyses colorées, à peine épaissies au sommet; spores se formant tard, petites 18-20 μ \times 10-12 μ . Taille grande, 10-15 cm. 11. *M. vulgaris* (Pers.), Pl. 202. (Précoce; bois argileux.)
 - 1^o Var. *alba*, blanche, très rare, Pl. 202 bis.
 - 2^o Var. *cinereus*, chapeau gris.
 - 3^o Var. *tremellodes*, déformation du type (non le *M. tremelloides* de Krombholz).
 - Espèce anglaise, n'existe probablement pas en France. Chapeau fauve, un peu pâle, côtes sinuées, appendiculées, émettant de courts prolongements vers le centre des alvéoles qui sont grands et irréguliers. Pied blanc
- 2. *M. Smithiana* Cooke. (Inconnue en France.)
- Chapeau fauve ochracé, arrondi plus rarement ovale ou même un peu conique; côtes sinuées, rarement appendiculées; alvéoles très amples, bien ouverts à plis rayonnant du centre. Pied égal au chapeau ou plus court, pâle, presque glabre, épaissi à la base, peu sillonné. Paraphyses à peine plus grosses au sommet; spores un peu jaune citrin (en masse), 20-23 μ \times 12-13 μ . Grande taille de 10-20 cm. et plus. 3. *M. rotunda* (Pers.), Pl. 195, texte 157 et 177. (En avril, à la lisière des bois, dans les haies et les parcs; terrains sableux.)
- 1^o Var. *alba*, rare; chapeau jaunissant en vieillissant.
- 2^o Var. *cinerea*, chapeau grisâtre, pied blanchâtre, assez rare (sa *M. procosa* Kromb.).
- 3^o Var. *fulva*; chapeau fauve, plus petit, ovale, pied blanc.
- 4^o Var. *pubescens*, à pied pubescent (Jura, envir. de Paris).
- Chapeau fauve verdâtre, ovale ou conique; côtes plus pâles, sinuées; alvéoles arrondis hexagonaux ou carrés, plissés du centre à la circonférence. Pied ochracé pâle grisâtre, furfuracé, robuste, épaissi à la base, sillonné. Paraphyses à peine épaissies au sommet; spores grandes 23-28 μ \times 15 μ . Grande taille de 15-20 cm. 1. *M. crassipes* Kromb. Pl. 194, texte 161. (Rare.)
- Chapeau d'un beau jaune ochracé (comme *M. rotunda*), primitivement conique puis oblong; côtes plus minces que dans *M. rotunda*; alvéoles amples, plus longs, moins arrondis, un peu serrés, moins profonds, à fond plat quand ils ne sont pas trop pressés. Pied blanchâtre, un peu épaissi à la base. Spores grosses 20-25 μ \times 13-14 μ . Taille 7-15 cm. 4. *M. rigida* Kromb. Pl. 198, texte 182. (Plus rare que *M. rotunda*.)
- Chapeau fauve pâle, ovale, côtes un peu flexueuses; alvéoles moitié plus petits que dans *M. rotunda*. Pied plus petit que le chapeau. Paraphyses rameuses, atténuées aux deux extrémités; spores 23-24 μ \times 13-14 μ . Taille plus petite 7-10 cm. 5. *M. ovalis* (Wallr.) Pl. 199, texte 168. (Assez rare.)

SECTION II. DISTANTES. Une valécule en haut du pied (peu apparente chez le *M. hortensis*).

- Chapeau conique.
 - × Pied plus petit que le chapeau; côtes noires ou noirissant.
 - Chapeau fauve ou fauve olivâtre, à la fin ovale oblong, moins ovale que *M. castata*; côtes subdivisées; alvéoles moins régulièrement serrés, moins carrés que dans *M. conica*. Pied blanc, plus pâle, très court, épaissi et sillonné à la base, moins furfuracé. Paraphyses rameuses, en masse; spores 22-27 μ \times 12-15 μ . Taille petite et moyenne de 3 à 8 cm. 16. *M. intermedia* Boud. Pl. 210, texte 186. (Fréquent dans les montagnes.)
 - Var. *acuta* Boud., petite taille, couleur plus foncée, alvéoles moins grands; chapeau beaucoup plus aigu (Bouen).

Figure 6 : Systématique des morilles d'après Boudier, 1897.

⌋⌋ Chapeau brun ou olivâtre, chapeau ovoïde conique ou ovoïde; côtes presque droites, peu écartées, rarement divisées ou anastomosées, formant des alvéoles primaires souvent de toute la longueur du chapeau; alvéoles secondaires nombreux, bien séries carrés ou rectangulaires. Pied blanchâtre ou légèrement ochracé, court 3^{es} 5, presque glabre, épaissi à la base; vallisécule bien visible. Paraphyses rameuses à extrémités épaissies; spores petites 12-20 μ × 12-13 μ. Taille 6-12 cm. (Toute la France; Fontainebleau, Senlis, Montmorency.)

(Souvent confondue avec *M. clata* mais moins élanée, alvéoles plus petits, moins carrés; pied plus court; station moins spéciale.)

× × Pied égal ou plus long que le chapeau; côtes noires ou noirissant.

⌋ Chapeau olivâtre; alvéoles amples très irréguliers non séries. Pied olivâtre, plus pile que le chapeau, à vallisécule très visible. Paraphyses non épaissies aux sommets; spores 25-28 μ × 15-18 μ. Taille 6-9 cm. (Odeur forte de *Sclerotium* à l'état frais; trouvée une fois en 1890 à Nice.)

⌋⌋ Chapeau fauve olivâtre; alvéoles primaires très longues, divisées en alvéoles secondaires nombreux, moins carrés que ceux de *M. conica*. Pied plus allongé et moins épais que le chapeau, plus cylindrique que dans *M. conica*, ochracé tendré, fortement furfuracé, à vallisécule bien visible. Spores 21-25 μ × 11-15 μ. Taille 10-12 cm. et plus. (Surtout méridional: Pyrénées-Orientales, Nice, Environs de Paris rare; Fontainebleau.)

⌋⌋⌋ Chapeau fauve ou fauve olivâtre; côtes stériles, peu divisées; alvéoles primaires allongés souvent de toute la longueur du chapeau; alvéoles secondaires bien séries, oblongs, rectangulaires ou carrés. Pied égal au chapeau égal ou atténué à la base, ochracé fauve, couvert de furfuracé convolvolé et serrés; vallisécule bien visible s'oblitérant avec l'âge comme dans n° 12 et 13. Paraphyses très légèrement en masse; spores 20-25 μ × 12-15 μ. Taille 5 à 10 cm. (En France, surtout dans l'Est; Jura, Vosges, Rhône, Alpes-Maritimes; rare aux environs de Paris.)

⌋⌋⌋ (Espèce douteuse, ressemblable à *M. conica*, mais spores arrondies) [Fontainebleau.]

⌋⌋⌋ Chapeau de *M. conica* (forme et couleur), mais cône plus allongé. Pied très large autant que le chapeau à la base. Spores 27-32 μ × 16-20 μ. Taille (Espèce américaine, trouvée en 1890 à Nice.)

⊞ Chapeau oblong ou ovale oblong (dans le *M. intermedia*, le chapeau est d'abord conique).

18. *M. costata*. Pl. 212, textes 129 et 130. (Assez commune, surtout dans les parcs.)

20. *M. inamoena* Boud. Pl. 215.

15. *M. distans* Fr. Pl. 207, texte 155. (Se distingue de *M. clata* par sa forme plus allongée, son chapeau plus aigu, ses alvéoles plus nombreux et plus petits.)

11. *M. conica* Pers. Pl. 206, texte 187. (Montagnes.)

12. *M. Finotii* Sarrazin et Feuill. (Sous les Pins d'un jardin.)

13. *M. angusticeps* Peck. Pl. 206, texte 169.

Mes noires ou noirissant.

Pied plus petit que le chapeau.

⌋ Chapeau ochracé ou ochracé fauve, oblong ou atténué; alvéoles primaires séparés par des côtes rarement divisées; alvéoles secondaires bien séries, séparés par des côtes non flexueuses. Pied furfuracé. Paraphyses épaissies au sommet; spores 20-23 μ × 13-14 μ. Taille 6-9 cm. (Rare en France; Vosges, Jura, Nice. Jamais aux environs de Paris.)

1^{er} Var. *purpurascens*, rose ou purpurascé.

2^e Var. *elegans* Boudier, plus grande 10-20 cm., se rapprochant de *M. distans* (rare; Nice, à Paris une fois chez un marchand; Chartres en serre.)

⌋⌋ Chapeau brun ou olivâtre; côtes presque droites, peu écartées, rarement divisées ou anastomosées; alvéoles primaires de la longueur du chapeau; alvéoles secondaires nombreux, séries, carrés ou rectangulaires. Pied blanc, légèrement ochracé, presque glabre, épaissi à la base, à vallisécule bien visible. Paraphyses rameuses à extrémité épaissie; spores de 20-20 μ × 12-13 μ... (Toute la France; assez commune; Fontainebleau, Montmorency, Senlis.)

(Souvent confondue avec *M. clata*; mais à station moins particulière.)

⌋⌋⌋ Chapeau d'abord conique (Voir plus haut.)

⌋⌋⌋ Chapeau brun clair; côtes ondulées, très peu ramifiées, allant du haut en bas du chapeau; alvéoles régulières. Pied pointillé de gris. Taille de 6 à 9 cm. (Environs de Nice.)

× × Pied non plus petit que le chapeau, cylindrique, non épaissi à la base, souvent sillonné, fortement furfuracé, gris ochracé. Chapeau cylindrique, obtus au sommet, fauve ochracé souvent purpuracé; alvéoles séries, plus amples que dans les n° 17 et 18, plus ou moins carrés. Paraphyses non épaissies au sommet; spores grosses, 20-28 μ × 15-17 μ. Taille 6-12 cm. (Jura, Vosges, Alpes, Pyrénées; Nice, Lyon; rare aux environs de Paris; Senlis.)

⊞ Côtes pâles. Chapeau brun non noirâtre; côtes flexueuses, appendiculées; alvéoles primaires fusiformes allongés; alvéoles secondaires nombreux, séries à côtes souvent fertiles. Pied blanc un peu fauve, subtomenteux, furfuracé, à vallisécule étroite peu apparente. Paraphyses colorées en masses fusiformes; spores 25-30 μ × 16-18 μ. Taille 5 à 12 cm. (Environs de Paris; Montmorency, Meaux et probablement toute la France.)

Var. *vaporaria* de Brundeau, taille plus grande; alvéoles moins réguliers, pied bosselé, côtelé sillonné (Agen). (Espèce voisine de *M. vulgaris* qui est sans vallisécule; à alvéoles très irréguliers cérébriformes; à côtes très appendiculées; à paraphyses très peu épaissies au sommet; à spores de 18-20 μ de long.)

17. *M. hortensis* Boud. Pl. 204, texte 117. (Dans les jardins, les serres, sur pots de fleurs.)

15. *M. deliriosa* Fr. (Vergers sablonneux ou charbonnés; en plaines et peu dans les bois.)

18. *M. costata* Vent. Pl. 212, texte 129-130. (Dans les parcs.)

16. *M. intermedia* Boud. Pl. 210, texte 186.

M. eximia Boud. Pl. 208, texte 532.

19. *M. clata* Fr. Pl. 213, texte 526. (Fréquente sous les sapins en montagne; tardive, en juin.)

Figure 6 : Systématique des morilles d'après Boudier, 1897.

Mitrospora. Partie inférieure du cliapeau séparée du pied.

+ Cliapeau non emarginé.

o Taille du Champignon *variable de 3 à 10 cm.* Cliapeau fauve ochrace, *arrondi* ou *ovale* ; alvéoles amples anguleux presque arrondis non rétrécis un à peine. Pied *blanc*, cylindrique peu farfourcé, à peine épaissi à la base, qui est un peu sillonné.

1. *Mit. pusilla* Pers
(Jarvis.)

(Rare dans la rég. paris. et la France.)

oo Taille du Champignon variant de 3-8 cm. Cliapeau fauve ochrace, *obtus* ; alvéoles secondaires quadrangulaires mal séries. Pied fauve ochrace *pile*, cylindrique, *fusiforme*, sillonné. Paraphyses rameuses à extrémité arrondie (en bou tons) ; spores hyalines 21-23 x 8-9 μ.

2. *Mit. fusca* (Pers)
Pl. 217, texte 167.

(Toute la France mais assez rare : Paris, Fontainebleau, Soumev, Charleville, Nice.)

ooo Taille du Champignon de 5 cm à 17 cm. Cliapeau *arrondi*, très allongé, un peu *obtus*, brun ochrace fauve ; côtes *noires* ; alvéoles jamais en séries larges, quadrangulaires ou polygonaux, profonds, à fond plat. Pied *verâtre* pointillé, plus petit que le cliapeau.

Mit. Hirsuta Boud.

Pl. 219, texte 127.

+ Cliapeau *convexe* court, souvent pointu, fauve ou *brun obscur* ; côtes *renfoncément noires* ; alvéoles secondaires quadrangulaires, peu nombreux. Pied ochrace ou ochrace pale, d'abord très court et lisse, puis *très allongé*, cylindrique un *fusiforme*, sillonné, *noirâtre fusiforme*, paraphyses rameuses, à extrémité souvent *spatule* en bou ton *arrondi* ; spores grandes, 21-22 x 14-17 μ, ochrace ou *noire*. Taille de 10-15 cm.

3. *Mit. hybrida* (Pers)
Pl. 216, texte 172.

(*Mit. rimosipes* est un état plus avancé de *M. umbilicata*.)

(Rare.)

Vie. *rossispes* Vent. à pied *renflé* à la base (rare). Terrains plus secs ; Pont-Chartrain et environs de Paris. Moutier-roméyl.

(Terrains secs, sous les arbres, bois ombreux, humides, plantés en pentilles, avri-mai, même mois.)

Figure 6 : Systématique des morilles d'après Boudier, 1897.

- *Sectio Adnatae*: la plupart des espèces de cette section ont le chapeau arrondi ou oblong. Ce groupe comprend: *Morchella crassipes* Krombh., *M. smithiana* Cooke, *M. rotunda* Pers. (avec quatre variétés: *alba*, *cinerea*, *fulva* et *pubescens*), *M. rigida* Krombh., *M. ovalis* Wallr., *M. umbrina* Boud., *M. spongiola* Boud., *M. vulgaris* Pers. (avec trois variétés: *cinerascens*, *albida* et *tremelloïdes*), *M. olivea* Quel. et *M. rudis* Boud.

- *Sectio Distantes*: le chapeau de ces espèces est de forme conique et les alvéoles primaires, allongées ou fusiformes, sont divisées en alvéoles secondaires par des cloisons transversales. Ce groupe comprend: *M. conica* Pers., *M. finoti* Sarr. et Feuill., *M. angusticeps* Peck., *M. distans* Fr., *M. deliciosa* Fr. (avec deux variétés: *purpurascens* et *elegans*), *M. intermedia* Boud. (et sa variété *acuta*), *M. hortensis* Boud. (et sa variété *vaporaria*), *M. costata* Vent. (et sa variété *acuminata*), *M. elata* Fr. (et sa variété *purpurascens*) et *M. inamoena* Boud.

- le genre *Mitrophora* Lév. présente une vallécule représentant environ la moitié chapeau. Ce genre comprend les espèces: *Mitrophora patula* Pers., *Mitrophora fusca* Pers., *Mitrophora semilibera* (D.C.: Fr.) Lév (et sa variété *crassipes* Vent.).

1.2.1.2 Classification selon Heim (1936)

Heim établit une clé de détermination des principales espèces de morilles qui utilise en particulier la présence ou l'absence de côtes longitudinales sur l'hyménium.

- morilles adnées:

- avec côtes longitudinales: *M. vulgaris* Pers.
- sans côtes longitudinales: *M. rigida* Krombh., *M. crassipes* Krombh., *M. umbrina* Boud., *M. rotunda* Pers.

- morilles distantes: *M. hortensis* Boud., *M. inamoena* Boud., *M. costata* vent., *M. intermedia* Boud., *M. conica* Pers., *M. distans* (Fr.) Boud., *M. elata* (Fr.) Boud.

- mitrophores: *Mitrophora semilibera* (D.C.: Fr.) Lév., *Mitrophora fusca* Pers.

Essai pour une clé de détermination des espèces du genre *Morchella*

Essai pour une clé de détermination des espèces du genre *Morchella*

Section *morchella* distantes

Sous-section *papyracea*

Spores de grande taille (moyenne supérieure à 25 µm), carpophore à chair mince, prenant en herbier une consistance papyracée, alvéoles primaires contenant des alvéoles secondaires sériées de forme généralement quadrangulaire.

- Vallécule très profonde** par un pied adhérent à l'intérieur du chapeau, à la mi-hauteur de ce dernier.
M. hybrida (Sow. ex Pers.) Boudier
- Carpophore allongé mais d'apparence trapue, **pas de vallécule profonde**, mais seulement bien visible sur les jeunes exemplaires. Pied de largeur légèrement inférieure à celle du chapeau, qui est de forme pyramidale dans la jeunesse. Ensuite le pied devient plus long que le chapeau qui, lui, reste toujours de forme allongée et conique.
M. angusticeps (Peck) Boudier

Voir également *M. conica* N° 13, morille des conifères à chair épaisse.

Morilles fragiles et cassantes

- Carpophore très étroit tout en hauteur, **chapeau plus court que le pied**, longuement conique, vallécule bien visible.
M. distans (Fr.) Boudier
Chapeau plus long que le pied, presque obtus.
M. distans f. *longissima* Jct
Chapeau intermédiaire aux deux précédents, conique, s'élargissant nettement vers la base, sous noisetiers.
M. distans f. *spathula* Jct

Sous-section *semi-carneosa*

- Spores petites ou moyennes**, chapeau ovoïde (voir N° 4), cylindrique, lancéolé, toujours allongé pour les spécimens adultes. **Habitats non sylvestres** (voir N° 4 et 5).
- Exceptionnellement, pas de vallécule**, mais des côtes longitudinales irrégulières formant des alvéoles primaires et secondaires également irrégulières.
M. hortensis Boudier
 - Vallécule étroite mais nettement apparente**, carpophore cylindrique à côtes formant des alvéoles primaires et secondaires également régulières et très nombreuses.
M. costata (Vent.) Boudier
Carpophore allongé, étroitement conique et acuminé, espèce toujours petite.
M. costata var. *acuminata*
Habitats sylvestres surtout conifères, plus rarement sous feuillus.
stirpe de *M. elata* N° 6, 7a, b, c.
 - Pied plus ou moins côtelé à furfuration plifère. Côtes noires sur les exemplaires adultes, alvéoles secondaires grises, régulières, espèce-type mais rare.
M. elata (Fr.) Boudier
 - 7a. Côtes noires**, alvéoles secondaires irrégulières devenant roses, espèce répandue en Europe.
M. purpurascens Jct var. *purpurascens* (Krombh.) Boudier
 - 7b. Côtes violettes**, alvéoles secondaires de couleur verte.
M. purpurascens var. *ionovirdis* Jct

7c. Côtes noires, alvéoles secondaires régulières de couleur rose, assez semblable au type, présence d'hétéroparaphyses.
M. purpurascens f. *heteroparaphysa* Jct

Espèce des feuillus, plus rarement des conifères, stirpe *elatoides* N° 8a et 8b.

8a. Alvéoles primaires et secondaires irrégulières, espèce des charbonnières mais aussi des arbres à feuilles caduques, présente également sous conifères.
M. elatoides Jct

8b. Alvéoles primaires peu nombreuses, alvéoles secondaires à côtes basses peu marquées. Carpophore étroit et plutôt pointu.
M. elatoides var. *elegans* Jct

Espèce pollue des prairies de haute montagne N° 9.

9. Alvéoles primaires assez régulières, contenant des alvéoles secondaires au nombre de deux ou trois par alvéoles primaires. Chapeau en fer de lance, conique, rarement un peu obtus, d'apparence frisée à l'état jeune.
M. elatovelutipes Jct

Sous-section *carneosa*

Morilles des conifères N° 10 et 13.

Morilles des conifères et des frênes N° 11.

Morilles des charbonnières mais aussi des conifères N° 12

10a. Côtes longitudinales rectilignes, noirissantes, alvéoles secondaires sériées.
M. eximia Boudier

10b. Côtes longitudinales épaisses et nettement fendues. Carpophore blond ocracé dans la jeunesse, côtes noirissantes. **Alvéoles secondaires sériées** mais parfois rectangulaires dans le sens de la hauteur.
M. eximia f. *schizocostata* Jct

11. Côtes longitudinales et alvéoles irrégulières, non sériées mais profondes. Chapeau oblong et dans ce cas obtus, mais pouvant devenir longuement conique dans la sénescence. Carpophore n'atteignant que rarement une grande taille.
M. intermedia Boudier

12. Côtes longitudinales régulières dès la jeunesse, blanches, puis souvent violacées à l'état adulte sur les sujets bien exposés au soleil. Alvéoles secondaires à côtes fertiles et alternées dans le jeune âge, puis ocracé-brunâtre sur les sujets adultes. Carpophore d'abord allongé et étroit, puis conique. Caractères microscopiques très voisins de l'espèce précédente. Surtout sur charbonnières.
M. delicosa (Fr.) Jct

13. Alvéoles primaires et secondaires assez régulières dans les côtes longitudinales seulement, bien marquées dans la jeunesse. Carpophore trapu à chapeau pyramidal chez les très jeunes exemplaires, plus rarement nettement élané à l'état adulte, il peut être conique, d'oblong à arrondi, pied de largeur variable, mais presque aussi large que le chapeau chez les sujets trapus.
M. conica (Pers.) Boudier

14. Alvéoles presque toutes primaires. Côtes épaisses et irrégulières, formant des alvéoles rappelant celles des morilles adnées. Carpophore à chapeau de forme conique, oblongue mais la plupart du temps franchement arrondi, forme toujours robuste.
M. heliana Boudier

Section *morchella* pseudoadnatae

Sous-section *carneosa*

Les morilles de cette section ont des affinités avec celles de la section précédente par des côtes plus ou moins épaisses et flexueuses, non rectilignes, à alvéoles secondaires absentes (exception pour le N° 15 de position incertaine) et surtout avec la section des morilles adnées par des alvéoles plus ou moins ouvertes mais présence d'une vallécule plus ou moins prononcée (N° 16) ou très nette (N° 18, 19, 20). Non précisée pour le N° 17.

15. Carpophore noir, entièrement velouté, possédant, d'après les dessins de Bride, des côtes et des alvéoles voisines de celles des morilles distantes, chapeau ovoïde pointu. Classé par Moser comme variété de *M. esculenta* (Pers. ex St-Amans), sur lieux incendiés.
*M. atrotomentosa*¹ (Moser) Bride

16. Carpophore rappelant *M. vulgaris* f. *oblonga* N° 23b à très profondes alvéoles.
M. rudis (Boudier) Jct

17. Pour mémoire: Alvéoles moins grandes que celles de *M. rudis*, à odeur de scléroderme.
M. inamœna Boudier

Vallécule nette et profonde

18. Chapeau conique, blond ocracé, rappelant *M. rotunda*, alvéoles à fond plat, réactions macrochimiques remarquables.
M. pseudorigida Jct²
= *M. conica* var. *rigida* Moser (?)

19. Alvéoles grandes et bien ouvertes, aspect de *M. rotunda*, var. *esculenta* Jct N° 27b. Chapeau de couleur verte par un pigment évanescence.
M. pseudovirdidis Jct

Prairies de haute montagne

20. Chapeau parfaitement rond, de couleur marron foncé, presque noir. Alvéoles petites, pied blanc mais à poils concolores, serrés en touffes dispersées et nombreuses.
M. umbrinovelutipes Jct

Section *morchella* adnatae

Sous-section *carneosa*

Les morilles de cette section ont des côtes épaisses ou minces, des alvéoles généralement irrégulières en taille comme en forme, plus ou moins ouvertes ou profondes. Les côtes, quand elles sont épaisses, deviennent rapidement furfuracées par nécrose et ne forment pas de vallécule à la jonction du pied et du chapeau. Nous distinguons deux stirpes:

1° Réaction à la teinture de gaïac apparaissant assez rapidement, de cinq minutes à une demi-heure après la touche à la base du pied. Asques à paroi épaisse, fortement spumoux, se formant tardivement comme nous avons pu l'observer après Boudier. Paraphyses abondantes.

Stirpe de *M. vulgaris*

2° Réaction à la teinture de gaïac absente ou faible, d'une à plusieurs heures quand elle a lieu. Asques à paroi plus mince, nombreux dès le jeune âge, paraphyses plus rares, spumosité rapidement évanescence.

Stirpe de *M. rotunda*

Stirpe de *M. vulgaris*

Carpophore de petite taille

21a. Chapeau noir, parfaitement rond, de 4 à 5 cm; d'apparence frisée, côtes minces, contenant des petites alvéoles, régulières et très nombreuses.
M. umbrina f. *microalveola* Jct

21b. Chapeau noir, rond ou un peu conique, côtes épaisses, rapidement furfuracées par nécrose. Alvéoles largement ouvertes et grandes pour la taille du champignon.
M. umbrina Boudier f. *macroalveola* Jct

Carpophore de taille moyenne

22a. Carpophore noir mais assez rapidement grisâtre, côtes pâles, épaisses, s'amincissant rapidement. Assez tardivement furfuracées par nécrose. Alvéoles irrégulières, largement ouvertes sur les exemplaires adultes et parfois à fond plat; sous divers arbres à feuilles caduques mais surtout sous chênes.
M. pseudoumbrina Jct

22b. Mêmes caractères microscopiques que le type mais le carpophore est de forme nettement ovoïde.
M. pseudoumbrina var. *ovalis* Jct
= *M. ovalis* (Wallbr.) Boudier

Carpophore de grande taille, espèces grises ou noirâtres

23. Côtes épaisses, difformes, parfois appendiculées, furfuracées par nécrose. Alvéoles très irrégulières, profondes.

M. vulgaris (Pers.) Boudier var. *alba* Boudier, f. *rubens* Jct
a) f. *conicoides* Jct, b) f. *oblonga*, voir p. 85

Carpophore de très grande taille, spores de moyennes à grandes

24. Espèce massive à pied obèse vers la base, difforme, plus long que le chapeau qui est de couleur grise, puis brunâtre à la maturité des spores. Alvéoles grandes et ouvertes.

M. crassipes (Krombh.) Boudier

1.2.1.3 Classification selon Dennis (1978)

Dennis scinde les *Morchellaceae* en deux tribus:

- Tribu *Heterogeneae*: hyménophore alignant de nombreuses et vastes cavités peu profondes séparées par des arêtes stériles, le carpophore possédant toujours un pied. Cette tribu comprend deux genres:

- le genre *Morchella* à chapeau en forme de massue séparé du pied par un sillon peu profond, contenant les espèces suivantes: *M. esculenta* Pers., *M. elata* Fr., *M. hortensis* Boud..
- le genre *Mitrophora* à chapeau suspendu, libre dans sa partie inférieure et formant un collier détaché autour de la partie supérieure du pied, contenant l'espèce *Mitrophora semilibera* (D.C.: Fr.) Lév.

- Tribu *homogeneae*: hyménophore lisse ou veiné non interrompu par des arêtes stériles. Cette tribu comprend trois genres distingués par les caractères suivants:

- chapeau conique ou cylindrique détaché du pied et entourant le pied au sommet duquel il est accroché:
 - + surface hyméniale sillonnée, asque bisporé: **genre** *Ptychoverpa* avec l'espèce *Ptychoverpa bohémica* (Krombh.) Boud.
 - + surface hyméniale lisse ou ridée seulement verticalement: **genre** *Verpa* avec l'espèce *Verpa conica* Swartz. ex. Pers.
- hyménophore lisse, aplati ou convexe, souvent veiné, presque sessile: **genre** *Disciotis* avec l'espèce *Disciotis venosa* (Pers.) Boud.

1.2.1.4 Classification selon Jacquetant (1984)

Jacquetant classe les morilles en trois sections:

- section *Distantes*: espèces à chapeau séparé du pied par un espace, nommé vallécule, de profondeur variable (à l'exception de *M. hortensis*). Les côtes sont régulières, plus ou moins flexueuses sur certaines espèces, partant du sommet du chapeau et allant jusqu'à sa base, pouvant se diviser en alvéoles primaires qui contiennent elles-mêmes des alvéoles secondaires à côtes fertiles plus basses que les alvéoles primaires. Le chapeau est de forme lancéolée, pyramidale, rarement arrondie, à sommet plus ou moins aigu ou obtu.

- section *Pseudoadnatae*: côtes irrégulières, n'allant pas du sommet à la base du chapeau, mais rappelant par l'épaisseur de leur chair, la forme de leur chapeau et les alvéoles toutes primaires plus ou moins ouvertes, les morilles de la section *Adnatae*.

- section *Adnatae* : espèces à chapeau non séparé du pied par une vallécule. Le chapeau est de forme conique, oblongue ou arrondie. Les côtes sont épaisses au moins dans le jeune âge, irrégulières, parfois anastomosées ou minces, entourant les alvéoles qui sont toutes primaires, bien ouvertes et assez régulières. Cette section est formée de deux stirpes fondées sur les caractères microscopiques et les réactions macrochimiques: la stirpe de *M. vulgaris* et celle de *M. rotunda*.

Les différentes espèces reconnues par Jacquetant sont présentées dans la figure 7.

1.2.2 Biologie de la morille

1.2.2.1 Les spores

Les spores de morille sont ellipsoïdales et de taille variable (9-20 X 17-32 μm) (Molliard, 1905). Leur paroi externe épaisse, de couleur fauve, est ornée de guttules lipidiques externes (Berthet *et al.*, 1975). Très tôt après leur individualisation dans l'asque, ces spores sont plurinucléées et, à maturité, elles comportent plusieurs dizaines de petits noyaux (Buscot, 1987). Ce caractère cytologique est considéré comme la marque d'un haut degré d'évolution (Berthet, 1964).

Dans la nature, la sporulation se produit le matin pendant plusieurs jours. Les spores sont projetées à une trentaine de centimètres au-dessus du sol puis disséminées par les courants aériens (Falck, 1920). Au laboratoire, la sporulation peut être obtenue en exposant les ascocarpes pendant quelques minutes sous une lampe à incandescence.

A l'issue de la dernière vague de sporulation, les ascocarpes subissent une autolyse remarquablement rapide et deviennent impropres à tout usage en quelques dizaines de minutes (Buscot, 1987).

La germination des spores peut être obtenue en quelques heures sur un milieu composé d'eau glucosée (Molliard, 1905). Lorsqu'elles sont maintenues au sec, ces spores conservent leur pouvoir germinatif pendant plusieurs années (Falck, 1920).

1.2.2.2 Le mycélium

Les hyphes de morilles sont cloisonnées et ramifiées; leur section est comprise entre 5 et 25 μm (Molliard, 1905). Le mycélium issu de la sporulation est d'abord blanchâtre, puis selon le contexte écologique, il se colore rapidement en brun ou en beige (Molliard, 1905).

Les hyphes issus d'un semis monosporal peuvent s'anastomoser entre elles ou avec les hyphes d'un autre thalle. Cette propriété n'a pas permis de déterminer la nature homo- ou hétérothallique du genre (Hervey *et al.*, 1978).

Chaque article mycélien comporte jusqu'à vingt noyaux (Berthet, 1964).

1.2.2.3 Les sclérotés

Molliard (1905) a fait état de l'existence de sclérotés chez les morilles. Ce sont de faux tissus constitués d'hyphes courtes et déformées qui ne possèdent pas la structure différenciée en plusieurs assises que l'on rencontre chez les sclérotés tels que ceux de *sclerotinia* (Willet et Wong, 1971). Dans leur brevet pour la culture de morilles Ower et ses collaborateurs (1986) ont montré l'importance des sclérotés pour le développement des fructifications de morilles. Volk et Leonard (1990) ont même montré que les sclérotés constituaient le point clé de la fructification. Buscot (1987 et 1993) a distingué deux types de sclérotés se développant en culture sur milieu synthétique. En se basant sur leur contenu en mycosporines, Buscot et Bernillon (1991) identifient ces deux types comme étant respectivement des primordia de fructification et l'équivalent des agrégats souterrains qui dans la nature jouent un rôle d'organe de réserve. Miller et ses collaborateurs (1994) ont montré que les sclérotés pouvaient être pérennes dans le sol. Les sclérotés de morille pourraient donc avoir deux grands rôles:

- rôle de primordium de fructification parfaite comme chez *Coprinus congregatus* (Durand, 1983 et 1985), ou imparfaite comme chez *Sclerotinia sclerotiorum* (Buscot, 1987),
- rôle d'organe de réserve comme chez *Sclerotinia sclerotiorum* (Cooke, 1970 et 1971), ou de résistance comme chez *Botrytis convoluta* (Buscot, 1987).

1.2.2.4 Le stade conidien

L'existence d'un stade conidien de la morille a été démontrée par Molliard en 1905. Ce stade correspond au *Constantinella cristata* précédemment décrit par Matruchot (1892) qui l'avait classé chez les mucidinée. Depuis cette première description le stade conidien a été obtenu sur des cultures en milieu ouvert (Cailleux, 1968; Ower, 1982) et sur des cultures pures de *Morchella elata* par Berthet (cité par Buscot, 1987). La rareté de ces observations et

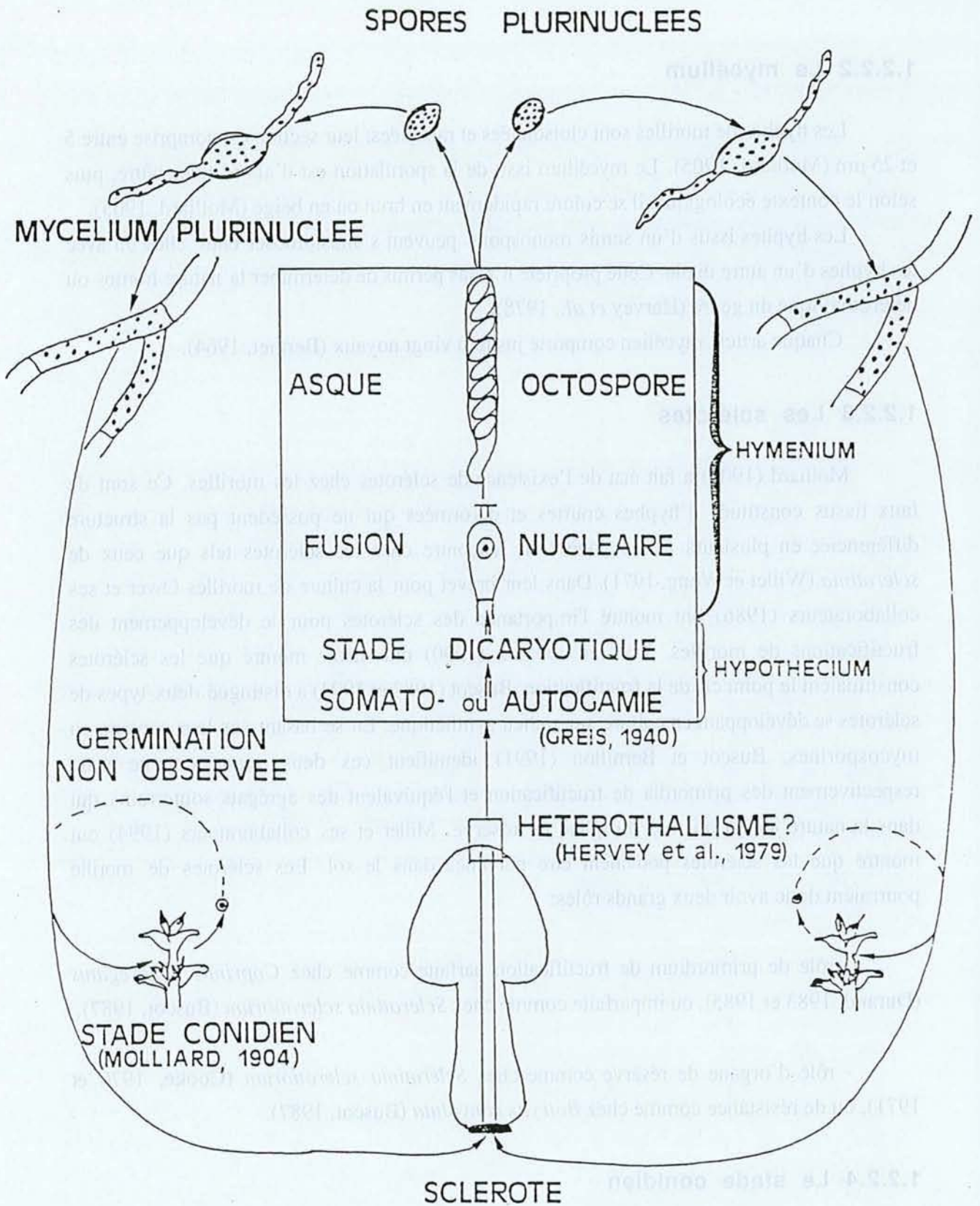


Figure 7: Cycle biologique de la morille tel que les travaux antérieurs permettent de l'établir (d'après Buscot, 1987). Les points d'interrogation concernent des phases qui restent hypothétiques.

l'apparente incapacité des conidies à germer incitent Berthet à considérer le stade imparfait de la morille comme une forme régressive; il se peut même, que chez certaines espèces, ce stade ait disparu au cours de l'évolution.

1.2.2.5 L'homo ou l'hétérothallisme des morilles

L'impossibilité de maîtriser le cycle de la morille en conditions contrôlées a jusqu'à présent empêché la détermination du caractère homo- ou hétérothallique de ce champignon. Cependant, en procédant à de nombreuses séries de cultures de thalles, chacun issu d'une unique ascospore, on a pu mettre en évidence l'existence d'au moins deux classes de mycélium, caractérisées respectivement par leur abondance et leur pauvreté en hyphes aériennes (Hervey *et al.*, 1978). Selon les auteurs de ces travaux, deux hypothèses peuvent rendre compte d'un tel comportement:

- les noyaux de fusion des cellules ascogènes sont hétérozygotes vis-à-vis de ces caractères morphologiques dont le lien avec la sexualité n'est cependant aucunement démontré,
- tous les asques d'un même ascocarpe ne sont pas issus de la même paire de noyaux.

Les auteurs considèrent le dimorphisme du mycélium comme la marque d'un hétérothallisme bipolaire qui ne s'exprime qu'à certaines phases du développement du champignon. Cette question est de toute façon compliquée par les échanges de noyaux consécutifs aux anastomoses végétatives, lesquels peuvent contribuer à masquer un éventuel hétérothallisme.

La figure 7' illustre le cycle biologique de la morille tels que les travaux antérieurs permettent de l'établir.

1.2.3 Ecologie de la morille

Malgré le grand intérêt gastronomique et donc économique des morilles, peu d'études écologiques poussées leurs ont été consacrés. La connaissance de l'écologie des morilles reste donc fragmentaire.

1.2.3.1 Epoque de la fructification et rythme biologique

Bien que le phénomène ait parfois été observé, la fructification automnale des morilles est très rare (Estève, 1986). Les morilles sont en effet avant tout des champignons à

fructification vernale. Selon les espèces et les lieux de récolte la période de fructification varie du mois de février au mois de juin.

D'une façon générale, l'apparition des carpophores des différentes espèces de morilles correspond à la réalisation de conditions climatiques particulières (Estève, 1986). La fructification apparaît dans des conditions d'humidité de l'air et du sol élevées, après une période froide marquée, suivie d'un réchauffement rapide. Les observations écophysiologicals réalisées sur *Mitrophora semilibera* et *M. esculenta* par Buscot (1989) indiquent que la température du sol à laquelle la fructification est initiée est spécifique alors que la somme de température ensuite nécessaire à l'avènement de chaque phase de développement des ascocarpes (préémergence, émergence puis sporulation) est identique chez les différentes espèces.

1.2.3.2 Facteurs stationnels

Nature du sol

Les morilles exigent des sols à texture équilibrée (exceptée *M. spongiosa* var. *dunensis*). Elles sont rares sur les terres argilo-sableuses et argilo-limoneuses, et absentes sur les argiles lourdes, les limons argileux, les sols limoneux et les limons fins (Bucl, 1973). Elles exigent une humidité du sol élevée, mais pas d'eau stagnante (Delmas, 1974). La structure du sol doit assurer à la fois une rétention d'eau suffisante et un bon drainage.

La comparaison de sols favorables à la morille à des sols qui le deviennent provisoirement à la suite d'incendies de forêts a permis de mettre deux facteurs favorables en évidence (Kaul, 1975):

- les pH alcalins,
- un taux de calcium élevé.

L'ensoleillement

Les morilles sont rares dans les bois sombres. En revanche elles se développent bien dans les bois clairs et en terrains découverts (Delmas, 1974).

Topographie et altitude

A l'échelle de la France les morilles poussent aussi bien sur les pentes que sur les terrains plats et ce qu'elle que soit l'orientation (Estève, 1986). Il existe cependant des

particularités si l'on tient compte des espèces et des régions. Ainsi dans l'Est de la France, on trouve peu de morilles dans les pentes exposées au nord.

Delmas (1974) observe que la plupart des morilles adnées sont des espèces de faible ou moyenne altitude (à l'exception de *M. crassipes*). A l'opposé, le groupe des morilles distantes comprend surtout des espèces d'altitude (à l'exception de *M. hortensis* et de *M. costata* qui se rencontrent rarement en altitude élevée).

Données phytosociologiques

a/ Autres champignons présents sur les stations de morilles

Il existe peu d'études sur la mycosociologie des morilles, cependant les amateurs savent que *Disciotis venosa*, une autre morchellacée, peut précéder *M. vulgaris*. On l'appelle à ce titre «la mère des morilles». D'autres ascomycètes tels, *Helvella sp.*, *Tuber sp.* et *Verpa sp.* ont de rares fois été observés sur des placettes à morilles (Estève, 1986).

b/ Plantes supérieures

La fidélité des morilles à certaines espèces végétales a été décrite de longue date (Tableau 1). Quelques auteurs ont observé des relations mycéliennes directes entre les ascocarpes et des racines ou tubercules de plantes supérieures (Tableau 2). Ces relations morilles-plantes supérieures ont surtout été étudiées à la fin du siècle dernier, où les auteurs les ont considérées comme parasites. Le premier, Matruchot (1909) a envisagé la possibilité d'associations mycorhiziennes. Cependant, après les travaux de Molliard (1904, 1905) qui a surtout étudié la croissance saprophytique et même obtenu des fructifications, cet axe de recherche avait été abandonné. Ainsi en 1936 Heim considérait que la morille est un genre saprophyte, dont «certaines espèces sont capables d'une association écologique, voire trophique avec d'autres végétaux». Récemment des études de terrain sont venues confirmer la dualité des associations contractées par la morille avec des plantes supérieures. Buscot et Roux (1987) ont décrit des cas de parasitisme. Puis Buscot et Kottke (1990) et Buscot (1994) ont montré par des études cytologiques que *M. esculenta* et *M. elata* peuvent former des ectomycorhizes secondaires au moment de la fructification. Des essais de synthèse réalisés par Buscot (1992b) ont confirmé le parasitisme sur des racines d'ordre II. En revanche cet auteur n'a pas obtenu de mycorhizes caractéristiques en conditions contrôlées.

Plantes	Références
Equisetaceae <i>Equisetum hiemale</i>	Buscot et Roux, 1987
Polypodiaceae (espèce non indiquée)	Lakhanpal <i>et al.</i> , 1990
Pinaceae <i>Abies alba</i> , <i>Pinus banksiana</i> , <i>Picea abies</i>	Jacquetant, 1984; Duchesne et Weber, 1993; Buscot et Roux, 1987; Clowez et Wipf, 1997
Magnoliaceae <i>Magnolia sp.</i>	Clowez et Wipf, 1997
Fagaceae <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus sp.</i>	Jacquetant, 1984; Buscot et Roux 1987
Betulaceae <i>Betula sp.</i> , <i>Carpinus betulus</i> , <i>Alnus sp.</i>	Jacquetant, 1984
Corylaceae <i>Corylus avellana</i>	Jacquetant, 1984, Buscot et Roux, 1987
Ulmaceae <i>Ulmus miror</i> , <i>Celtis australis</i>	Jacquetant, 1984; Buscot et Roux, 1987; Clowez et Wipf, 1997
Rosaceae <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus spinosa</i> , <i>Crataegus monogyna</i> , <i>Rubus fruticosus</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Pyrus communis</i>	Clowez et Wipf, 1997; Buscot et Roux, 1987; Philippoussis et Balis, 1995; Jacquetant, 1984
Fabaceae <i>Robinia pseudoaccacia</i>	Philippoussis et Balis, 1995
Aceracea <i>Acer pseudoplatanus</i>	Clowez et Wipf, 1997
Cornaceae <i>Cornus sanguinea</i>	Buscot et Roux, 1987
Apiales <i>Hedera helix</i>	Clowez et Wipf, 1997

Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i>	Condamy et Cornu, 1878
Salilicaceae	<i>Populus nigra</i>	Jacquetant, 1984; Clowez et Wipf, 1997
Oleaceae	<i>Fraxinus excelsior, Ligustrum vulgare, Olea europaea, Syringa vulgaris</i>	Robert, 1865; Jacquetant, 1984; Buscot et Roux; Clowez et Wipf, 1997
Asteraceae	<i>Cynara scolymus, Helianthus tuberosus, Hieracium murorum, Taraxacum sp.</i>	Jacquetant, 1984; Buscot et Roux, 1987
Liliaceae	<i>Allium ursinum</i>	Buscot et Roux, 1987
Buddeljaceae	<i>Buddleja</i>	Clowez et Wipf, 1997

Tableau 1: Liste de plantes supérieures sous lesquelles des poussées de morilles ont été décrites.

Espèce	Plantes associées	Observations	Références
<i>M. esculenta</i>	<i>Vitis vinefera</i>	Parasitisme	Condamy et Cornu, 1878
<i>M. esculenta</i>	<i>Oleaceae; Cornaceae</i>	Parasitisme	Robert, 1865; Buscot et Roux, 1987
<i>M. esculenta</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	Parasitisme	Roze, 1883
<i>M. spongiola</i>	<i>Poacea</i>	Parasitisme	Romagnesi, 1963
<i>M. semilibera</i>	<i>Ulmus minor</i>	Ectomycorhizes	Matruchot, 1909
<i>M. esculenta</i>	<i>Piceaabies</i>	Ectomycorhizes	Buscot et Kottke, 1990
<i>M. elata</i>	<i>Piceaabies</i>	Ectomycorhizes	Buscot, 1994

Tableau 2: Travaux rapportant des relations entre le mycélium de morille et des organes souterrains de plantes supérieures.

Habitats perturbés

Les plus grandes poussées de morilles sont observées sur des sols récemment perturbés à la suite de catastrophes naturelle (feux) ou d'actions anthropiques. On relate aussi des poussées de morilles dans des conditions surprenantes: trou d'obus, tapis dans une maison bombardée, os, vieilles rames de papier, huile de vidange, mâchefer dans une cuisinière abandonnée (Estève, 1986).

1.2.3.3 Rythmes endogènes

Comme précisé au paragraphe 1.2.3.1 la fructification vernale des morilles est largement dépendante de l'évolution des conditions climatiques au sortir de l'hiver. Cependant on ne peut exclure qu'un rythme endogène soit aussi impliqué dans la fructification et plus généralement dans le déroulement du cycle biologique de la morille. Ainsi Schmidt (1983) a montré qu'en milieu naturel, la germination de spores ne survient qu'au printemps; à ce jour il n'existe pas de confirmation expérimentale du phénomène. En revanche, Buscot (1987) a montré qu'en conditions contrôlées constantes, la formation de sclérotés est maximale au printemps et à l'automne, mais très faible en hiver. Cette rythmicité est observée sur des souches cultivées pendant plusieurs années en conditions artificielles.

1.2.3.4 Synthèse des données sur l'écologie de la morille

Publication n°1

La morille dans l'écosystème forestier.

Wipf, D., F. Buscot et B. Botton (1994)

Bulletin de la Société Française d'Ecophysiologie 19, F1-2, 55-60

Ainsi que l'a montré la première partie du présent chapitre, les données sur l'écologie de la morille sont nombreuses mais éparses. Jusque dans les années récentes peu d'auteurs avaient tenté une interprétation générale de ces données. Après que Volk et Leonard (1990) aient proposé une interprétation du cycle biologique de la morille, Buscot (1992a) a présenté un travail équivalent pour les aspects écologiques. Dans cet article l'auteur considère que les poussées de morilles en habitat perturbé relèvent d'une stratégie pionnière, alors que les associations aux végétaux dans des habitats stables relèvent d'une stratégie de colonisation pérenne. La publication n°1 qui est présentée ici est un article de synthèse bibliographique qui s'inscrit dans ce schéma interprétatif.

LA MORILLE DANS L'ECOSYSTEME FORESTIER.

WIPF DANIEL¹, BUSCOT FRANCOIS² & BOTTON BERNARD¹.

¹ Laboratoire de Biologie Forestière, Université Henri Poincaré-Nancy I, B.P. 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

² Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany.

RESUME - Les Morilles peuvent se développer selon deux stratégies écologiques distinctes. La stratégie dite "rudérale" aboutit à des fructifications éphémères sur des sols récemment bouleversés et résulte d'un développement autonome et saprophytique de la Morille. L'autre stratégie dite "pérenne" aboutit à la fructification pendant plusieurs années. Les ascocarpes sont reliés par des cordons mycéliens à des agrégats fongiques, formés autour des racines conductrices, et dans ces conditions, le mycélium de la Morille s'associe à des racines déjà mycorhizées par d'autres espèces fongiques. Des expérimentations *in vitro* ont confirmé que la Morille est capable de s'associer avec des racines d'épicéa, de pin ou de chêne en donnant naissance, soit à des sclérotés autour des racines, soit à un véritable réseau de Hartig et un manteau à la condition qu'une bactérie du genre *Bacillus* soit présente.

MOREL IN FOREST ECOSYSTEM. Morels have two ecological strategies. They can establish ephemerally as saprophytes on recently disturbed soils. In stable ecosystems, they give rise to fruit bodies durably. In this case they contract two types of association with plants; forming either sclerotia on roots or "ectomycorrhizal" association which require the presence of bacteria belonging to the genus *Bacillus*.

MOTS CLÉS: *Morchella*, stratégies écologiques, saprophytisme, association, cycle biologique.

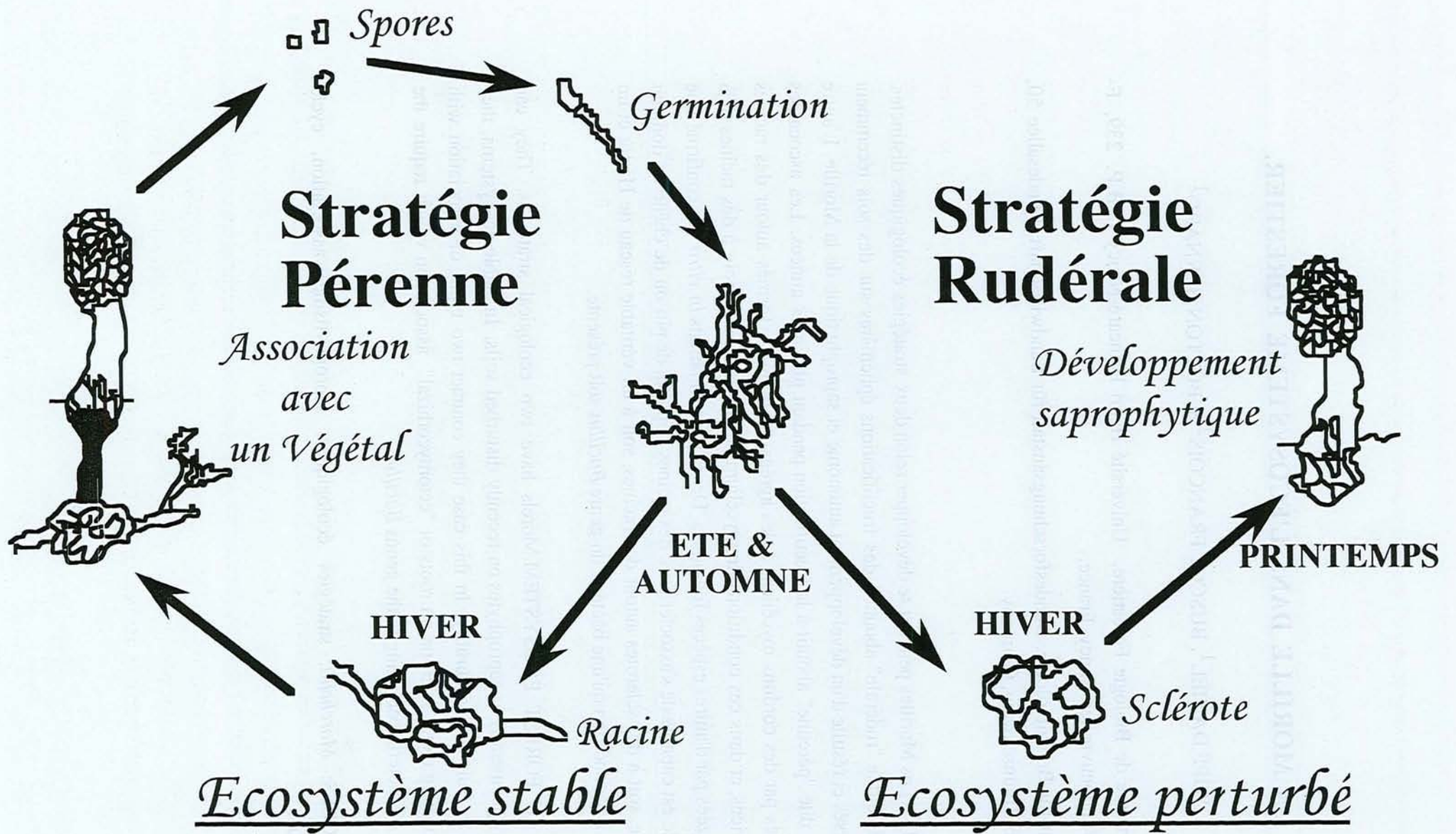


Figure 1: Schéma récapitulatif des deux stratégies écologiques de la Morille et de leur imbrication. (D'après BUSCOT, 1992a).

Les Morilles sont des ascomycètes de la classe des discomycètes, du groupe des Pézizales archaïques et de la Famille des Morchellacées. Ces champignons sont présents, pour la plus grande majorité, dans les régions tempérées. Dans ces écosystèmes, la Morille peut développer deux stratégies écologiques distinctes (BUSCOT, 1992a).

Stratégie écologique "rudérale"

Cette stratégie aboutit à des fructifications parfois abondantes, mais toujours éphémères sur des sols récemment bouleversés, par exemple à la suite de feux de forêts (TURNAU, 1984; DUCHESNE ET WEBER, 1993), d'éruptions volcaniques (CARPENTER *ET AL.*, 1987) ou de l'emploi de pesticides (TURNAU, 1987). Cette stratégie est dite "rudérale" (Fig.1) Le développement de la fructification dans de telles conditions n'a pas été étudié *in situ*, mais il semble cependant qu'il résulte d'un développement autonome de la Morille, ce qui correspond à un mode de nutrition exclusivement saprophytique. Cette hypothèse, corroborée par la capacité bien connue du mycélium à une croissance saprophytique (WILLAMET *AL.*, 1956; BUSCOT, 1992a), a été confirmée expérimentalement par l'obtention de fructifications saprophytiques et par ailleurs semblables à celles qui, dans la nature, permettent des fructifications "rudérales" (MOLLIARD, 1905; OWER *ET AL.*, 1986; BUSCOT, 1992a). Les ascocarpes se développent alors aux dépens de sclérotés qui, chez la Morille, s'édifient secondairement lorsqu'un mycélium primaire a épuisé les ressources en azote du milieu (MAYR, 1982; BUSCOT, 1992a). Ainsi, en se basant sur des critères morphologiques, MAYR (1982) distingue deux types de sclérotés qui correspondent respectivement à des ascocarpes abortifs et à une forme d'accumulation de réserves. Cette distinction a été confirmée par BUSCOT (1987, 1992b) qui, en raison de leurs conditions de formation, a nommé ces deux types de sclérotés "Early Encrusting Sclerotia" (EES) et "Late Isolated Sclerotia" (LIS). Les EES sont assimilables à des primordia d'ascocarpes, les LIS étant une forme d'accumulation de réserves et de résistance au froid.

Stratégie écologique "pérenne"

La seconde stratégie aboutit à la fructification de Morilles dans un écosystème moins perturbé. La production d'ascocarpes est alors peu abondante, mais une placette donnée produit pendant plusieurs années (BUSCOT, 1987), ce qui correspond à une stratégie dite "pérenne". En milieu forestier les ascocarpes sont reliés par des cordons mycéliens à des agrégats mycéliens souterrains, formés autour de racines conductrices (BUSCOT ET ROUX, 1987). L'association rhizofongique a lieu avant la fructification vernale, les ascocarpes se développant en utilisant les réserves accumulées dans les agrégats mycéliens

souterrains (BUSCOT, 1989). Parallèlement ces mêmes agrégats produisent, également au printemps, un front mycélien qui s'associe à de jeunes racines déjà mycorhizées par d'autres espèces fongiques (BUSCOT ET KOTTKE, 1990; BUSCOT, 1991).

Des expérimentations *in vitro* ont confirmé que le mycélium de Morille est capable d'établir des associations avec des racines d'épicéa, de pin ou de chêne (BUSCOT, 1992a). Lors de ces travaux, on a noté deux types d'association possibles (BUSCOT, 1992a):

* d'une part, en présence d'une bactérie du genre *Bacillus* qui peut être isolée à partir des ascospores, le mycélium de Morille peut provoquer la formation de racines à l'aspect de mycorhizes, mais qui ne présentent pas de réseau de Hartig (BUSCOT, 1992c).

* d'autre part, le champignon peut former des LIS autour de la partie âgée et conductrice des racines. Cette association est favorisée quand le mycélium est pré-cultivé sur un milieu pauvre, et la plante préalablement mycorhizée par un autre champignon. La relation est de nature saprophytique, car le champignon ne pénètre que les assises cellulaires secondaires et mortes des racines âgées. Les LIS synthétisent un "lait" qui contient des exoenzymes de type laccases et peroxydases (BUSCOT, 1992b), ce qui pourrait permettre à la Morille de mobiliser le carbone à partir de molécules complexes. Une telle aptitude a déjà été caractérisée chez des champignons ectomycorhiziens facultatifs (HASELWANDER ET AL., 1990).

Rapport entre les deux stratégies

La Morille possède donc deux stratégies écologiques distinctes (Fig. 1), l'une pérenne et l'autre rudérale. Ces deux stratégies ne semblent pas devoir être indépendantes. Les Morilles ne possèdent pas de propagules capables de survivre dans le sol entre deux poussées rudérales. La colonisation de sols récemment bouleversés devrait donc faire suite à un apport exogène de spores postérieur au bouleversement. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les fructifications rudérales n'interviennent qu'après au moins une saison végétative après le bouleversement. De même, il semble probable qu'au cours d'un épisode rudéral, un mycélium s'associant à un système racinaire poursuive son développement selon le mode pérenne.

Stratégies biologiques

De nombreux champignons mycorhiziens renforcent leur potentiel génétique lors de leur phase symbiotique par l'augmentation du nombre de noyaux (AGERER, 1991). Les travaux de BERTHET (1964) ont montré que l'évolution des Discomycètes a été marquée par l'apparition puis l'amplification de la coenocitie, qui a atteint son développement maximal chez les Morchellacées. Chez la Morille les spores sont en effet plurinucléées avant même l'individualisation de leur paroi dans l'asque, et les articles mycéliens peuvent comprendre

jusqu'à une quarantaine de noyaux (WILLAM *ET AL.*, 1956; BUSCOT, 1987). Le mycélium de Morille possède la capacité de former des anastomoses végétatives permettant des échanges de noyaux y compris entre souches différentes (BRESINSKY *ET AL.*, 1972). La réalisation de confrontations binaires entre souches monosporales a permis d'observer la formation de barrages de mycélium aérien lorsque les souches confrontées ne sont pas issues d'une même ascospore (HERVEY *ET AL.*, 1978). VOLK ET LEONARD (1989) ont nommé ces barrages "mycelial meld", et à l'aide de souches mutantes, ont montré la nature hétérocaryotique de ce mycélium. BUSCOT (1987, 1992b) a montré que, cultivées sur un milieu riche en azote, les souches polysporales de Morille ont tendance à s'isoler les unes des autres et à édifier des "mycelial melds" à leur frontière. En revanche, sur un milieu pauvre en azote, elles forment un mycélium caractérisé par une parfaite homogénéité physiologique et de développement, et dont les aptitudes morphogènes renforcées semblent indiquer la nature hétérocaryotique (BUSCOT, 1992a). Ainsi suivant le contexte trophique, différentes souches monosporales de Morille se séparent en ne formant, au niveau de leurs zones d'insertion, qu'un mycélium hétérocaryotique à potentiel de croissance réduit, ou alors fusionnent en un mycélium unique caractérisé par un fort potentiel de développement, qui pourrait être hétérocaryotique. Ceci expliquerait le passage entre les deux stratégies écologiques de la Morille, le mycélium de ce champignon résistant mal à la compétition avec d'autres espèces fongiques ou bactériennes (BUSCOT, 1987). Dans les conditions de développement pérenne, au sein d'écosystèmes plus fermés et caractérisés par une pression de concurrence accrue, le champignon accède plus difficilement aux éléments nutritifs disponibles. Les résultats obtenus en culture *in vitro* (BUSCOT, 1992a) suggèrent que les Morilles produisent alors un mycélium hétérocaryotique vigoureux; le potentiel génétique renforcé de ce mycélium permettrait alors au champignon de contracter des relations équilibrées avec les racines secondaires, bactéries et champignons mycorhiziens primaires.

BIBLIOGRAPHIE

AGERER R., 1991 - Characterization of ectomycorrhiza. In *experiments with mycorrhizas, séries: Methods in Microbiology* vol. 23 (NORRIS J.R., READ D.J. et VARMA A.K.), Academic Press, NEW York: 26-73.

BERTHET P., 1964 - Essai biotaxonomique sur les Discomycètes. *Thèse d'état*, Faculté des sciences de Lyon: 160 p.

BRESINSKY A., GLASER W. et STANGL J., 1972 - Untersuchungen zur Sippenstruktur der Morchellaceen. *Ber. Bayer. Bot. Gesel.* 43:127-143.

BUSCOT F., 1987 - Contribution à l'étude d'une espèce de Morille de la forêt rhénane: *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier; perspectives de domestication. Thèse d'état, Université de Strasbourg: 179 p.

BUSCOT F. et ROUX J., 1987 - Association between living roots and ascocarp of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 89: 249-252.

BUSCOT F., 1989 - Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.* 116: 425-430.

BUSCOT F. et KOTTKE L., 1990 - The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.* 116: 425-430.

BUSCOT F., 1991 - Mycorrhizal succession and Morel biology. Abstract of the 3 ESM, 19-23 August 1991, Sheffield.

BUSCOT F., 1992a - Stratégies écologiques et biologiques des Morilles. *Cryptog., Mycol.* 13 (3): 171-179.

BUSCOT F., 1992b - Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.* 97 (2): 136-140.

BUSCOT F., 1992c - Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *J. Plant Physiol.* 141: 12-17.

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

CARPENTER S.E., TRAPPE J.M. et AMMIRATI J.R., 1987 - Observations of fungal succession in the Mont-St Helens devastation zone 1980-1983. *Can. J. Bot.* 65: 716-728.

DUSCHENE L.C. et WEBER M.G., 1993 - High incidence of the Edible Morel *Morchella conica* in a Jack Pine, *Pinus banksiana*, Forest following prescribed burning. *Can. Field - Natur* 107: 1 (Jan-Mar 1993): 114-116.

HASELWANDER K., BOBLETER O. et READ D.J., 1990 - Degradation of ^{14}C -labelled lignin and dehydropolymer of coniferyl alcohol by ericoïd and ectomycorhizal fungi. *Arch. Microbiol.* 153: 352-354.

HERVEY A., BISTIG G. et LEONG I., 1978 - Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269-1274.

MAYRR., 1982 - Untersuchungen zum wachstum und zur Entwicklung einiger Arten der Mykorrhiza bildenden Gattung *Morchella*. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*, Universität Giessen: 135p.

MOLLIARD M., 1905 - Production expérimentale de l'appareil ascospore de la Morille. *Compt. Rend. Hebd. Scéances Acad. Sci.* 140: 1146-1148.

OWER R., MILLS G.L. et MALACHOWSKI J.A., 1986 - Cultivation of *Morchella*. *U.S. Patent*, nb 4,594,809.

TURNAU K., 1984 - Post-fire cup-fungi of Turbacz and Stare Wiechy montains in the Gorge Range (Polish Western Carpathians). *Prace Botaniczne* 12: 145-170.

TURNAU K., 1987 - An emergence of *Morchella semilibera* D.C. Fr. after application of gesaprim 50. *Prace Botaniczne* 15: 153-157.

VOLK T.J. et LEONARDT J., 1989 - Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia* 81: 523-531.

WILLAM A., TRZCINSKI T. et WILLAM-ENGELS L., 1956 - La croissance du mycélium de la Morille. *Mushroom Sci.* 3: 283-308.

Chapitre II: Objectifs



La synthèse bibliographique du chapitre précédent montre qu'entre les voies du saprophytisme, du parasitisme et de la symbiose, il est parfois difficile de définir le mode de nutrition adopté par un champignon donné.

La morille est un organisme pour lequel un développement saprophytique a été établi sur la base de cultures de mycélium sur boîtes de Pétri. Cependant, ce champignon peut également au cours de son développement contracter des relations trophiques avec les organes souterrains de plantes supérieures (**Publication 1**). Les travaux menés à ce jour ont montré des cas de parasitisme d'organes végétaux, des relations dont la nature est à préciser avec des mycorhizes d'autres espèces fongiques, enfin la possibilité de formation de mycorhizes secondaires à réseau de Hartig peu développé. On ne peut prétendre que ces travaux procurent une vision exhaustive de cet aspect important de l'écologie de la morille. Aussi l'un des objectifs de ce travail a-t-il été d'approfondir l'étude des relations rhizofongiques par des études de terrain et des expérimentations. Le chapitre " VI: Biologie de la morille " et la **publication 6** sont consacrés à cet aspect. La faiblesse des données sur les rythmes endogènes de la morille a également incité à entreprendre une étude rigoureuse de cette propriété qui fait obstacle à la reproductibilité de travaux expérimentaux (Buscot, communication personnelle) et rend donc leur interprétation difficile. Cette étude a porté sur la germination des spores.

La synthèse bibliographique a également montré que la systématique des morilles reste à éclaircir. Cette situation constitue un handicap sérieux pour l'étude de certains aspects de l'écologie du groupe. Ainsi, en l'absence de définition rigoureuse de la notion d'espèce,

est-il extrêmement difficile de progresser dans l'étude de la biologie des populations et en particulier des interactions somatiques (passage à l'hétérocaryon) en jeu lors de changements de modes de nutrition observés dans la nature. Aussi le second volet du présent travail a-t-il été consacré à adapter des outils moléculaires tels que l'analyse du polymorphisme isoenzymatique et de l'ADN aux morchellacées et à évaluer leur capacité à résoudre les ambiguïtés systématiques. Les **publications 2, 3, 4 et 5** sont consacrées à cet aspect.

Chapitre III: Matériels et méthodes



3.1 Matériel fongique

3.1.1 La Morille (*Morchella* sp.)

la partie expérimentale de ce travail a porté sur les quatre genres de morchellacées *Morchella*, *Disciotis*, *Mitrophora* et *Verpa*, ainsi que sur le genre *Gyromitra* qui appartient à la famille des helvellacées. Lorsque ce matériel fongique consistait en des souches issues de la germination d'ascospores, celles ci ont été déposées à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (collection allemande de micro-organismes et cultures cellulaires). Une partie des analyses de biologie moléculaire a également porté sur des *excicata*. La liste complète de ce matériel est donnée en annexe 1. Son identification a été réalisée par les légateurs.

3.1.2 Conditions de culture

Germination des spores

La germination des spores est obtenue en quelques heures sur un milieu composé d'eau glucosée (5 g.l⁻¹ glucose) (Molliard, 1905) dans une étuve à 24° C. Lorsqu'elles sont maintenues au sec, les spores conservent leur pouvoir germinatif pendant plusieurs années (Falck, 1920). Les spores germées sont soit utilisées pour l'obtention de nouvelles souches, soit comptées après 8 h à l'aide d'une loupe binoculaire Zeiss pour évaluer la capacité de germination de la sporée à différentes périodes de l'année.

Les souches obtenues sont entretenues sur milieu MEA gélosé (agar 20 g.l⁻¹, extrait de malt 10 g.l⁻¹ et glucose 5 g.l⁻¹) en boîtes de Petri, jusqu'à utilisation.

Cultures en milieu liquide

Que ce soit pour l'étude des polymorphismes génomique et protéique ou pour les essais de synthèse les souches de morille sont cultivées en Erlenmeyer dans 100 ml de milieu MEA (extrait de malt 10 g.l⁻¹ et glucose 5 g.l⁻¹) sur un agitateur rotatif à plateaux (GFL 3020). Chaque Erlenmeyer est ensemencé par un cylindre d'agar prélevé à la partie périphérique des thalles cultivés en boîtes de Pétri.

Quatre jours après l'inoculation, le mycélium est récolté en conditions axéniques, séché, puis lyophilisé pendant 48 heures.

3.1.3 Variations endogènes du pouvoir germinatif des spores.

Afin de vérifier l'existence d'un rythme endogène chez les morilles, le pouvoir germinatif des spores a été mesuré tous les mois, de septembre 1994 à mai 1997, pour trois souches de *Morchella conica* (Co1, 2 et 3) et une souche de *M. spongiola* var. *dunensis* (Du1). Le premier jour de chaque mois les spores sont mises à germer comme décrit dans le paragraphe 3.1.2, et pour chaque sporée, quatre comptages portant sur 50 spores sont réalisés, à partir desquels le pourcentage de germination est déterminé.

3.1.4 Essais de confrontation avec des plantes supérieures

Pour tester l'association morille-arbre deux espèces de végétaux supérieurs sous lesquelles des poussées de morilles ont été observées sont utilisées.

3.1.4.1 *Pinus banksiana*

Afin d'éviter des attaques parasitaires à l'issue de la germination, et de lever la dormance, les graines de *Pinus banksiana* Lamb., provenant de la région de Trois Rivières (Québec), sont stérilisées dans de l'eau oxygénée à 30% (v/v) pendant 60 min. puis rincées dans de l'eau stérile pendant 4 heures selon le protocole décrit par Duponnois et Garbaye (1991) pour les graines de Douglas. Les graines sont ensuite mises à germer sur un lit de tourbe dans une étuve à 24°C pendant 8 jours. La croissance des germinations est obtenue dans une chambre de culture avec les paramètres suivants: température 24° C le jour, 18°C la nuit; photopériode de 16 heures avec une intensité lumineuse de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 80% d'humidité relative le jour et 60% la nuit. Les plants sont arrosés deux fois par semaine avec la solution nutritive décrite par Ingestad (1979). La solution nutritive est constituée (mg.l^{-1}) de: NH_4NO_3 (100), Na_2HPO_4 (20), KCl (40), CaCl_2 (40), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20), Fe-EDTA (5,6) $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001), $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,006), H_3BO_3 (0,09), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1) et $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,7).

3.1.4.2 *Betula pendula*

Les graines de *Betula pendula* Roth. provenant de la région de Björnberget (Suède) sont désinfectées par incubations successives dans une solution d'éthanol à 95% (v/v), puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à 3,5% (p/v) sous agitation douce pendant 30 minutes. Elles sont ensuite abondamment rincées dans plusieurs bains d'eau distillée stérile (4 fois 10 min, puis une fois 12 h) et mises à germer sur un lit de tourbe à l'obscurité durant

3 jours à 24°C. Les plants poursuivent leur croissance en chambre de culture dans les mêmes conditions que *P. banksiana*.

3.1.4.3 Essais de confrontation

Après 48 jours de préculture pour les pins et 40 jours pour les bouleaux (à ces stades les plantules présentent de nombreuses racines secondaires) les plantes sont coinoculés par une souche de *Morchella esculenta* (A7) et une souche de *M. elata* (E1) précultivées sur des grains de blé enrobés de gaze et mis en agitation 8 jours dans du milieu MEA. Cette méthode permet à la morille de se développer après inoculation. Pendant toute la période de croissance en chambre de culture (8 à 10 semaines) les plants sont fertilisés deux fois par semaine avec la solution nutritive de Ingestad.

3.2 Etude électrophorétique du polymorphisme enzymatique

3.2.1 Extraction des protéines

Toutes les opérations d'extraction sont effectuées à 4°C. Le mycélium récolté est broyé au mortier, en présence de sable de Fontainebleau. Le tampon d'extraction, dont la composition est donnée dans le tableau 3, est utilisé à raison de 10 µl par milligramme de matière fraîche. L'extrait est ensuite centrifugé à 40000 g pendant 30 minutes, le surnageant ainsi recueilli constitue l'extrait brut.

Tampon d'extraction utilisé en isoenzymologie		
Composé	Concentration	
Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM	
Glycérol	10 %	(v/v)
Polyvinylpyrrolidone ou PVP	2 %	(m/v)
Polyvinylpolypyrrolidone ou PVPP	10 %	(m/m)
Na ₂ EDTA	2 mM	
MgSO ₄	5 mM	
Glutamate de sodium	10 mM	
2-mercaptoéthanol	14 mM	

Tableau 3: Tampon d'extraction des protéines solubles

3.2.2 Techniques électrophorétiques

3.2.2.1 Electrophorèse non dénaturante sur gel de polyacrylamide

Principe

Cette technique possède un haut pouvoir résolutif pour la séparation des protéines et surtout pour la détection d'isoformes d'une même enzyme. En effet, ces macromolécules sont soumises simultanément à une filtration moléculaire sur le tamis constitué par l'acrylamide et à une migration dépendant de leur charge dans un champ électrique. La technique employée s'inspire de celle utilisée par Davis (1964).

Protocole

L'électrophorèse est réalisée sur le système Miniprotean II de Bio-Rad à l'aide de plaques de verres de 8,2 x 10,1 cm enserrant un volume de 9 ml de gel à 6% de polyacrylamide. Les compositions respectives des gels de séparation et de concentration sont indiquées dans les tableaux 4a et 4b. L'échantillon à déposer est additionné de bleu de bromophénol (1%) qui permet de visualiser le front de migration, et de glycérol (1/5 du volume) pour augmenter sa densité. La migration des échantillons se déroule à 4° C et avec un ampérage fixé à 25 mA.

Le tampon d'électrophorèse utilisé est celui préconisé par Laemmli (1970):

Tris (pH 8,3)	6,8 mM
Glycine	129 mM

Composition du gel de concentration à 5% (volume final de 5 ml).

Composé	Concentration finale de la solution	Volume
Acrylamide	10 % (m/v)	1500 μ l
Bisacrylamide	2,5 % (m/v)	1500 μ l
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M	625 μ l
Persulfate d'ammonium	1,5 % (m/v)	250 μ l
TEMED	-	5 μ l
Eau ultrapure	-	1120 μ l

Composition du gel de séparation à 6% (volume final de 10 ml).

Composé	Concentration finale de la solution	Volume
Acrylamide	30 % (m/v)	1992 µl
Bisacrylamide	0,8 % (m/v)	1992 µl
Tris-HCl (pH 8,8)	1 M	3740 µl
Persulfate d'ammonium	1,5 % (m/v)	500 µl
TEMED	-	10 µl
Eau ultrapure	-	1766 µl

Tableaux 4a et 4b: Composition des gels de séparation et de concentration pour l'électrophorèse en conditions non dénaturantes.

3.2.2.2 Electrophorèse sur gradipore

Principe

La méthode consiste à effectuer une électrophorèse de l'enzyme en gel de polyacrylamide dont la porosité varie suivant un gradient d'acrylamide allant de 4 à 25 %. La migration de la protéine s'arrête lorsque celle-ci atteint la zone de concentration en acrylamide correspondant à sa taille.

Protocole

L'estimation de la masse moléculaire est réalisée selon la méthode décrite par Botton et Msatef (1983), et par Botton et Chalot (1991). Les gels sont étalonnés à l'aide du kit de protéines de masse moléculaire élevée (Pharmacia). Le tampon d'électrophorèse est constitué de:

Tris (pH 8.4)	90 mM
Acide borique	80 mM
Na ₂ EDTA	2.5 mM

Enzyme	Référence	Tampon	Substrat	Cofacteur	Colorant, catalyseur
Aspartate aminotransférase	1	0.1 M Tris-HCl (pH : 8)	acide L-aspartique	acide α - cétoglutarique	Fast Blue BB salt ou Fast Violet Blue
Glucose phosphate isomérase	2	0.2 M Tris-HCl (pH: 8) 1 mM EGTA	Fructose-6- phosphate	NADP	NBT, MTT et PMS
Glutamine synthétase	3	50 mM Tris-HCl (pH : 7.6)	acide L-glutamique	ATP	-----
NAD-glutamate déshydrogénase	4	50 mM Tris-HCl (pH : 7.6)	acide L-glutamique	NAD	NBT et PMS
NADP-glutamate déshydrogénase	3	50 mM Tris-HCl (pH : 7.6)	acide L-glutamique	NADP	NBT et PMS
NAD-glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase	2	0.2 M Tris-HCl (pH : 8) 1 mM EGTA	D-glyceraldéhyde- 3-phosphate	NAD	MTT et PMS
Malate déshydrogénase	5	0.2 M Tris-HCl (pH : 8) 1 mM EGTA	acide Malique	NAD	NBT et PMS
Superoxide dismutase	2	0.2 M Tris-HCl (pH : 8) 1 mM EGTA	-----	NAD	NBT et PMS

1: Chalot *et al.*, 1990; 2: Pasteur *et al.*, 1987; 3: Brun *et al.*, 1992; 4: Agustian *et al.*, 1994; 5: Vidal *et al.*, 1977.

Tableau 6: Liste des enzymes, références, tampons et méthodes de révélations utilisés.

Avant la migration, le gel est prééquilibré pendant 20 minutes à 70 volts. Après dépôt des échantillons, l'électrophorèse est d'abord réalisée à 70 volts pendant 15 à 20 minutes jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel. Elle est ensuite poursuivie à 150 volts (voltage constant) pendant 15 à 16 heures.

3.2.3 Révélation des activités enzymatiques

Les différentes protéines extraites sont révélées en présence des substrats, cofacteurs et colorants nécessaires à la mise en évidence de leur activité enzymatique. Les différences de mobilités électrophorétiques observables sont dues, soit à des différences de taille et de charge (gel natif), soit uniquement à une différence de masse moléculaire (gradipore).

Les enzymes retenues pour l'étude du polymorphisme enzymatique sont répertoriées dans le tableau 5. Certaines d'entre elles comme la glucose phosphate isomérase, la malate déshydrogénase, les glutamate déshydrogénases et la superoxyde dismutase, se sont déjà révélées plus ou moins efficaces pour la discrimination interspécifique de morille ou de mycorhizes de truffe (Kulkarni *et al.*, 1989; Yoon *et al.*, 1990; Dupré *et al.*, 1993). Le tableau 6 résume les principes de la révélation des différentes enzymes étudiées.

Enzyme	numéro E.C.	Abréviation
Aspartate aminotransférase	2.6.1.1	AAT
Glucose phosphate isomérase	5.3.1.9	GPI
Glutamine synthétase	6.3.1.2	GS
Glutamate déshydrogénase à NAD	1.4.1.2	GDH 1
Glutamate déshydrogénase à NADP	1.4.1.4	GDH 2
Glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase à NAD	1.2.1.12	GAPD
Malate déshydrogénase	1.1.1.37	MDH
Superoxyde dismutase	1.15.1.1	SOD

Tableau 5: Enzymes retenues pour l'étude du polymorphisme enzymatique de la morille.

3.3 Analyse du polymorphisme de l'ADN

3.3.1 Extraction de l'ADN total

Le protocole utilisé est inspiré de celui utilisé par Henrion (1993) et comprend les étapes suivantes:

1. Le mycélium (de 1 à 10 mg) est incubé 5 minutes à température ambiante, dans 500 µl de tampon d'extraction (100 mM Tris HCl (pH 9,0); 20 mM EDTA (pH 8,0); 1,4 mM NaCl; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoéthanol) dans des tubes à micro-centrifuger (Poly-labo).

L'EDTA étant un chélateur d'ions divalents limite les activités de nombreuses enzymes, telles que les DNases et les RNAases. Le CTAB est un détergent, il permet de solubiliser les membranes cellulaires.

2. Le matériel fongique est ensuite broyé pendant 5 minutes à l'aide d'un micromortier en plastique (Poly-labo), avant addition de 0,1 mg de protéinase K (Sigma).

La protéinase K complète l'action mécanique du broyage et digère les endonucléases.

3. Après une incubation du mycélium broyé pendant 1 heure à 65° C, les extraits sont centrifugés 5 minutes à 14000 g, à 4° C.

4. Aux surnageants récoltés sont ajoutés 500 µl d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (v/v). Les tubes sont vigoureusement agités, sur un agitateur de tube (Bioblock), puis centrifugé 15 minutes à 14000 g, à 4° C.

Cette étape a pour but de permettre l'élimination des débris cellulaires.

5. La phase aqueuse qui contient l'ADN, est récupérée puis débarrassée des traces de phénol résiduelles par addition de 500 µl de chloroforme. Les tubes sont à nouveau agités, puis centrifugés 5 minutes à 14000 g à 4° C.

6. La précipitation de l'ADN se fait par addition à la phase aqueuse de 1 ml d'éthanol à 96% (conservé à - 20° C), suivie d'une incubation d'une nuit au congélateur à - 20° C.

7. L'ADN est récupéré par centrifugation à 14000 g pendant 30 minutes à 4° C, puis débarrassé de sels éventuels par un lavage du culot avec 100 µl d'éthanol à 70% , suivi d'une seconde centrifugation à 14000 g pendant 5 minutes à 4° C.

8. L'ADN, présent dans le culot, est ensuite séché pendant 5 minutes à température ambiante, puis solubilisé dans 50 µl d'eau ultrapure (MilliQ, Millipore) à 65°C pendant 5 min.

3.3.2 Amplification enzymatique in vitro de l'ADN_r

Principe

L'amplification des différentes séquences de l'ADN_r nucléaire s'effectue sur l'extrait d'ADN total par PCR (Polymerase Chain Reaction ou "réaction de polymérisation en chaîne") selon le protocole de Saïki *et al.* (1985, 1988).

La méthode consiste en la synthèse de brins d'ADN à l'aide d'une polymérase thermostable et d'un couple de courtes séquences oligonucléotidiques synthétisées *in vitro* (Appligène). Les oligonucléotides complémentaires de l'ADN cible s'hybrident, et servent d'amorces en délimitant le fragment synthétisé. Après n cycles, on obtient 2^n molécules d'ADN cible.

Une première étape de dénaturation thermique de l'ADN bicaténaire permet de séparer les deux chaînes antiparallèles de la double hélice. Les amorces s'associent aux brins dénaturés lors du refroidissement. En présence d'une polymérase, d'amorces, et dans les conditions optimales pour l'enzyme, une réaction de polymérisation peut démarrer sur cette matrice. Un cycle de synthèse permet en 3 étapes (dénaturation, fixation des amorces et élongation) d'obtenir la duplication de la fraction d'ADN comprise entre les deux sites de fixation des amorces sur l'ADN initial, à condition que ceux-ci ne soient pas éloignées de plus de 2000 paires de bases.

Conditions expérimentales

Cette réaction s'effectue soit dans le thermocycleur "Crocodile III" (Appligène), soit dans le thermocycleur "Omnigene" (Hybaid). La polymérase utilisée est la *Taq* polymérase. Elle est extraite d'une bactérie thermophile *Thermus aquaticus* (Saïki *et al.*, 1988), et à ce titre elle reste active en dépit des incubations répétées à des températures proches de 100° C pendant les 35-40 cycles de l'amplification.

Mélange réactionnel

L'ADN total est dilué de façon à obtenir entre 0,1 et 1 ng d'ADN dans un volume de 50 µl, cette dilution est réalisée avec de l'eau ultra pure stérile (MilliQ, Millipore). Cinquante microlitres du mélange d'amplification (Tab. 7), contenant 20 mmoles de chaque dXTP, 20 pmoles de chaque amorce, 2,5 unités de *Taq* polymérase (Appligène), 1/10 de volume de tampon d'amplification sont ajoutés. Afin d'éviter l'évaporation des échantillons à 95 °C et la formation d'aérosols, le mélange réactionnel est recouvert de deux gouttes d'huile minérale.

Solution stock	Volume	Concentration	Quantité
Tampon 1X	10 µl	50 mM KCl; 10 mM Tris HCl pH 8.8; 1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 % triton X-100; 0,01 % gélatine.	
dXTP (10 mM)	2 µl	200 µM	20 nmoles
Oligonucléotide 1 (10 µM)	2 µl	0,2 µM	20 pmoles
Oligonucléotide 2 (10 µM)	2 µl	0,2 µM	20 pmoles
Eau stérile	33,5 µl		
Taq polymérase (5U/µl)	0,5 µl		2,5 Unités

Tableau 7: Composition du mélange réactionnel de l'amplification de l'ADN extrait.

Les amorces (synthétisées par Bioprobe Systems) choisies pour l'amplification de la région ITS sont ITS 1 et ITS 4, et pour la région IGS, CNL 12 et 5 SA (Tab. 8). Elles sont complémentaires de la partie terminale de l'ADN_r 17S pour ITS 1 et de la partie proximale de l'ADN_r 25S pour ITS 4, de la partie terminale de l'ADN_r 25S pour CNL 12 et de la partie proximale de l'ADN_r 5S situé à l'intérieur de la région intergénique (IGS) pour 5 SA (Fig. 8).

Nom	Séquence nucléotidique 5'→ 3'
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS 4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
CNL 12	CTG AAC GCC TCT AAG TCA G
5 SA	CAG AGT CCT ATG GCC GTG GAT

Tableau 8: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la réaction de polymérase en chaîne. (White, 1990; Henrion, 1993).

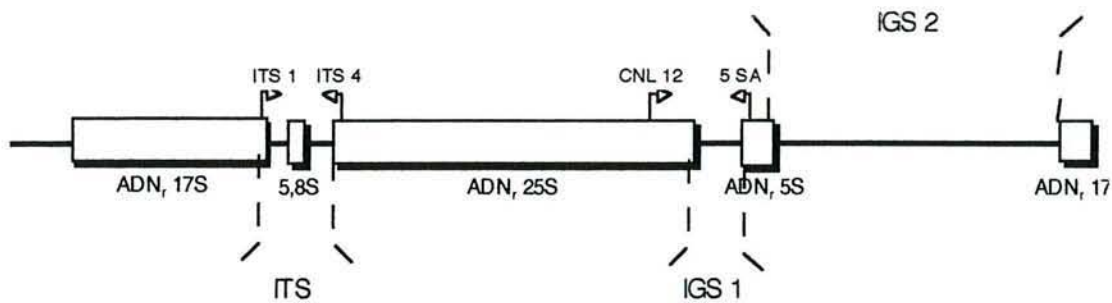


Figure 8: Représentation schématique de l'organisation de l'ADN_r des champignons et des sites d'hybridation utilisés. Les parties grisées représentent les gènes codant pour les ARNr 17S, 5,8S, 25S et 5S (dont les séquences sont très conservées). Les pointillés délimitent l'espaceur interne transcrit (ITS) et l'espaceur intergénique (IGS) qui sont des régions polymorphes. Ce schéma est répété de 200 à 450 fois.

Les tubes sont alors déposés dans le thermocycleur. Les paramètres d'amplification sont:

1. Dénaturation, 5 minutes à 95° C
2. Dénaturation, 2 minutes à 95° C
3. Hybridation des amorces, 30 secondes à 50° C
4. Élongation, 2 minutes à 72° C
5. Répétition 35 à 40 fois des étapes 2 à 4
6. Élongation finale, 10 minutes à 72° C.

Après amplification, les échantillons sont analysés directement ou conservés à 4° C.

3.3.3 Analyse électrophorétique de l'ADN

L'ADN amplifié ainsi que les produits de la restriction sont analysés sur des gels horizontaux d'agarose à 2% ou 1,5% (Agarose routine Eurogentec). La migration des échantillons s'effectue respectivement pendant 3 heures à 60 V ou 20 heures à 30 V, dans du tampon Tris-Borate-EDTA 1 X (108 g de Tris base + 55 g de borate + 40 ml d'EDTA 0,5M pH 8.0 + qsp 1 litre avec de l'eau ultra pure). Les fragments d'ADN sont visualisés par coloration au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml d'eau ultra pure) (Henrion, 1993). Le bromure d'éthidium en s'intercalant entre les bases de l'ADN permet de le visualiser par fluorescence aux U.V.. Les gels sont photographiés puis digitalisés et analysés en utilisant le programme Wincam 2.0 sur IBM PC.

Marqueurs de poids moléculaires utilisés (Boehringer Mannheim):

- Fragments d'ADN du phage λ digéré par *Eco* RI et *Hind* III;

- Fragments d'ADN du plasmide pUCBM21 digéré par *Hpa* II du plasmide pUCBM21 digéré par *Dra*I et *Hind* III;
- Fragments d'ADN du phage ϕ X174 digéré par *Hae* III.
- Fragments d'ADN du phage pBR 328 digéré par *Bgl* I additionnés de fragments d'ADN du phage pBR 328 digéré par *Hinf* I

3.3.4 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

Principe

L'analyse RFLP consiste en la digestion des produits d'amplification par différentes endonucléases pour obtenir des profils électrophorétiques comportant plusieurs bandes. Les fragments d'ADN obtenus sont en effet aisément séparés les uns des autres par électrophorèse sur gel d'agarose. La vitesse à laquelle ces fragments migrent est une fonction logarithmique inverse de leur longueur.

Conditions expérimentales

Les enzymes de restriction employées (Tab. 9) proviennent de chez Boehringer Mannheim. La digestion de l'ADN amplifié se fait à 37° C pendant une heure (dans nos expériences un temps supérieur n'a pas augmenté le rendement de la digestion) dans un volume réactionnel de 25 μ l (20 μ l d'amplifiat + 2,5 μ l de tampon d'incubation approprié concentré 10 fois fourni par le fabricant + 2 μ l d'eau ultra-pure stérile + 0,5 μ l d'endonucléase à 10 U.ml⁻¹). La totalité du volume réactionnel est déposée sur gel d'agarose.

Endonucléase	Site de restriction 5'--> 3'
<i>Eco</i> R I	G↓AATTC
<i>Hinf</i> I	G↓ANTC
<i>Rsa</i> I	GT↓AC

Tableau 9: Endonucléases utilisées et sites de restriction correspondants.

3.3.5 PCR aléatoire

La PCR aléatoire consiste à n'utiliser qu'une seule amorce et regroupe plusieurs approches qui se différencient par la taille et la séquence des amorces utilisées. Celle que nous avons retenue consiste à utiliser comme amorces, des séquences d'oligonucléotides de microsatellites.

En effet parmi les régions non codantes du génome, certaines sont hautement répétitives. On leur a donné le nom de séquences satellites, ou "Variable Number Tandem Repeat" (VNTR) de par leur disposition en périphérie de l'ADN après ultracentrifugation de ce dernier dans un gradient de chlorure de césium (Ludes et Mangin, 1992). Parmi ces VNTR certaines séquences plus courtes (environ 15 nucléotides) sont désignées sous le nom de microsatellites, ou "Short Tandem Repeat" (STR), ou bien encore "Simple Sequence Repeat" (SSR) (Cregan et al., 1994).

Nous avons utilisé les séquences SSR (GTG)₅ et (GACA)₄, synthétisées par MWG-BIOTECH. Le mélange d'amplification est en proportion le même que celui utilisé pour l'amplification des secteurs ITS et IGS1, le volume final est réduit à 50 µl.

Les paramètres d'amplification sont:

1. Dénaturation, 3 minutes à 94° C
2. Dénaturation, 40 secondes à 94° C
3. Hybridation des amorces, 1 minute à 62° C
4. Élongation, 1 minute à 72° C
5. Répétition 30 fois des étapes 2 à 4
6. Élongation finale, 10 minutes à 72° C.

Les produits d'amplification sont analysés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide avec un gel de concentration à 5% et un gel de séparation à 10%. L'échantillon à déposer est additionné de bleu de bromophénol (1%) qui permet de visualiser le front de migration, et de glycérol (1/5 du volume) pour augmenter sa densité. La migration des échantillons se déroule avec un voltage limitant de 500 V.

La révélation se fait au nitrate d'argent selon le protocole décrit par Bassam *et al.* (1991), modifié par Schwieger (communication personnelle):

1° Fixation	30 min	250 ml d'acide acétique 10% (v/v)
2° Lavage	3 X 2 min	3X 250 ml d'eau distillée
3° Coloration argentique	20 - 30 min	300 ml de nitrate d'argent 0,1% (p/v)
4° Rinçage	20 sec	250 ml d'eau distillée

5° Révélation		préparer 300 ml d'une solution à 2,5 % de Na ₂ CO ₃ avec 150 µl de formaldéhyde et quelques grains de sodium thiosulfate
	1 min	100 ml
	2-5 min	200 ml (contrôler la révélation)
6° Arrêt de la coloration	5 min	250 ml d'acide acétique 10% (v/v)

Le gel est ensuite imprégné pendant 15 min dans 250 ml d'acide acétique 10% (v/v) et de glycérol à 10% (v/v), puis séché à température ambiante. Les gels sont photographiés et digitalisés. La taille des produits d'amplification est déterminée par comparaison avec des marqueurs de poids moléculaires connus en utilisant le programme WinCam 2.0 sur IBM PC.

3.3.6 Séquençage

Les produits d'amplification de la région ITS ont été séquencés dans les deux sens par la société Génome-Express (Grenoble, France) selon la technique du "Gene-walking". La réaction de séquençage s'effectue par PCR dans un volume final de 20 µl en utilisant 100 ng de l'ADN amplifié, 5 pmoles d'amorces et 9,5 µl de "Dye Terminators premix" (Applied Biosystems). L'amplification débute par 2 min de dénaturation, puis se succèdent 25 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 55°C et 4 min à 60°C dans un thermocycleur "9600 thermal cycler" (Perkin Elmer). L'excès de réactifs est éliminé à l'aide de colonnes Quick Spin (Boehringer Mannheim). Les échantillons séchés par centrifugation et repris dans 4 µl d'EDTA (pH 8.0 + formamide déionisée (5/1)) sont ensuite placés dans un séquenceur Applied Biosystems 373A. Les produits de séquençage sont analysés sur un gel dénaturant d'acrylamide à 6% (temps de migration 12 h).

Les séquences sont enregistrées, analysées et alignées à l'aide du logiciel SeqApp 1.9 (Higgins *et al.*, 1992). Les recherches d'homologie sont réalisées dans les bases de données du National Center for Biotechnology Information à l'aide du programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Les analyses phylogénétiques sont effectuées en utilisant le logiciel PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993) et la version beta 4d55 de ce même logiciel.

3.4 Microscopie photonique

Des manchons mycéliens souterrains formés par *M. esculenta* autour de racines fines de frêne (*Fraxinus excelsior*) sont prélevés en sols forestiers lors de la saison de fructification. Après dissection de ces manchons, les racines mises à nues sont préparées en vue d'une étude anatomique en microscopie photonique.

3.4.1 Fixation

Des fragments racinaires (environ 1 mm de long) sont fixés dans une solution à 2% de glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,2).

Les échantillons sont alors stockés 6 mois à 4°C.

Après 3 ou 4 lavages dans le tampon les échantillons sont post-fixés dans une solution à 1% de tétraoxyde d'osmium, dans le même tampon pendant une heure à 0°C, puis lavés dans du tampon cacodylate.

3.4.2 Déshydratation

Les échantillons sont déshydratés dans des bains d'éthanol de concentration croissante selon le protocole suivant:

Degré d'alcool (% v/v)	Durée du bain (min)	Nombre de bains
10	10	3
20	10	3
40	10	3
60	10	3
80	10	3
95	10	4
100	15	4

L'alcool de déshydratation est ensuite remplacé progressivement par de l'oxyde de propylène, solvant de la résine utilisée.

3.4.3 Inclusion

Préparation de la résine Epon (Luft, 1961)

Le mélange suivant est réalisé:

Epon: Epikote 812	9,1 ml
DDSA (anhydride dodécénylsuccinique)	6,2 ml
MNA (anhydride méthylnadique)	4,7 ml
DMP ₃₀ (2-4-6 triméthylaminométhylphénol)	0,35 ml

Il est mélangé lentement avec un barreau magnétique, pendant 30 minutes environ, de façon à éviter la formation de bulles d'air.

Inclusion

L'oxyde de propylène, solvant de la résine, est ensuite progressivement remplacé par de la résine, jusqu'à ce que les échantillons se trouvent dans un bain de résine pure. Ils sont alors placés et orientés dans de petits moules. La résine est ensuite mise à polymériser 1 jour à 37°C puis 2 à 3 jours à 60°C.

3.4.4 Sections semi-fines

La polymérisation achevée, les blocs sont taillés à la lame à rasoir de façon à ce que l'objet se trouve au sommet d'une minuscule pyramide.

Des coupes semi-fines de 2 μm d'épaisseur sont réalisées sur un ultramicrotome automatique de type RMC MT-7 à l'aide d'un couteau de diamant, recueillies sur des lames de verre et colorées au bleu de toluidine avant d'être observées au microscope photonique.

**Première partie: Polymorphismes
isoenzymatique et génomique**

Chapitre IV: Polymorphisme isoenzymatique



Polymorphism in Morels: Isozyme Electrophoretic Analysis.

Wipf, D., J.P. Bedell, J.C. Munch, B. Botton et F. Buscot (1996)

Canadian Journal of Microbiology **42**, 819-827

L'objectif de ce travail était de vérifier l'adéquation du polymorphisme isoenzymatique à l'étude de la systématique des morilles en analysant une souche de l'helvellacée *Gyromitra esculenta* et, chez les morchellacées, une souche de *Disciotis venosa*, deux souches de morilles noires (*Morchella conica* et *M. angusticeps*) et dix souches de la morille jaune *M. esculenta*. L'analyse de ces dernières souches devait en outre permettre, au niveau intraspécifique, de caractériser les six mycéliums hétérocaryotiques obtenus à la suite de croisements entre quatre isolats monosporaux.

L'analyse a porté sur l'étude électrophorétique du polymorphisme isoenzymatique de la glutamine synthétase, la glutamate déshydrogénase à NAD, la glutamate déshydrogénase à NADP, l'aspartate aminotransférase, la malate déshydrogénase, la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase à NAD, la glucose phosphate isomérase et de la superoxide dismutase.

Sur tout le matériel étudié des activités GS, GPI, MDH et AAT ont pu être mises en évidence. La combinaison du polymorphisme de ces quatre enzymes a permis la séparation de toutes les souches, mais ne rend compte des relations phylogénétiques qu'à un niveau systématique élevé (genre). Ce résultat est conforme à ceux obtenus par d'autres auteurs sur la morille et montre que si l'analyse du polymorphisme isoenzymatique est un outil précieux pour caractériser des souches même très proches, il ne peut être utile pour traiter de questions systématiques chez les morchellacées.

Polymorphism in morels: isozyme electrophoretic analysis

Daniel Wipf, Jean-Philippe Bedell, Jean Charles Munch, Bernard Botton, and François Buscot

Abstract: The aim of this study was to assess whether isozyme polymorphism in different members of the *Morchellaceae* could be used to improve the systematics in this fungal group and to characterize intraspecific crossings between monosporal strains in *Morchella esculenta*. For this purpose, isozyme electrophoretic analysis of the following enzymes was performed: glutamine synthetase, NAD-glutamate dehydrogenase, NADP-glutamate dehydrogenase, aspartate aminotransferase, malate dehydrogenase, NAD-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, glucose phosphate isomerase, and superoxide dismutase. The analyses allowed discrimination at the inter- or intra-specific levels and could help to establish a method of identification for strains in the *Morchellaceae*. To a certain extent they appeared to be suitable to analyze interactions of monosporal strains of *Morchella esculenta* in pairing experiments. The polymorphism shown in this study was consistent with the phylogenetic relationships between the investigated strains only at the genus level.

Key words: isozyme analysis, electrophoresis, *Morchella* sp., polymorphism.

Résumé : L'objectif de ce travail était de vérifier l'adéquation du polymorphisme isoenzymatique à l'étude de la systématique des *Morchellaceae* et à la caractérisation de croisements intraspécifiques entre des souches monosporales de *Morchella esculenta*. Pour cela une analyse électrophorétique du polymorphisme isoenzymatique des enzymes suivantes a été réalisée : glutamine synthétase, glutamate déshydrogénase à NAD, glutamate déshydrogénase à NADP, aspartate aminotransférase, malate déshydrogénase, glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase à NAD, glucose phosphate isomérase et superoxyde dismutase. Ces travaux ont permis d'obtenir des discriminations interspécifiques et intraspécifiques, et donc de participer au développement d'une méthode d'identification de souches du groupe des *Morchellaceae*. La méthodologie permet en particulier l'analyse de croisements réalisés entre souches monosporales de *Morchella esculenta*. Le polymorphisme mis en évidence ne rend compte des relations phylogénétiques entre les souches étudiées qu'à un niveau systématique élevé (genre).

Mots clés : analyse isoenzymatique, électrophorèse, *Morchella* sp., polymorphisme.

Introduction

Many systematic classifications of morels have been proposed since the pioneer work of Boudier (1897). However, these systems are all based upon debatable morphological and typological criteria, so that the number of accepted species varies dramatically. For example, Korf (1972) has recognized only one morel species, whereas Jacquetant (1984) has defined 28.

To a certain extent, this controversy is due to the general lack of knowledge of morel reproductive biology and to the difficulty of assessing validity of typological species by mating experiments. For the same reason, experimental investigations of morel biology initiated by Hervey et al. (1978) were based

on studies of mycelial somatic interactions. The heterokaryotic mycelium with reduced growth potential, which forms at the border between non-self confrontations of monosporal strains, has been termed mycelial meld by Volk and Leonard (1989). Buscot (1993) has showed that mycelial melds only occur under conditions of high nitrogen supply. He has related this dual behaviour to two ecological strategies in nature (Buscot 1992). Ower et al. (1986) have recently described methods to produce ascomata at a commercial scale. This strengthens the need for precise identification to protect the commercial varieties.

Analysis of isozyme polymorphism has been used successfully for taxonomic studies in fungi (Magae et al. 1990; Roux and Labarere 1990; Royse and May 1990; Oudemans and Coffey 1991; Keller 1992; Agustian et al. 1994). This method was used for morels by Gessner et al. (1987) and Yoon et al. (1990) to characterize geographic isolates of *Morchella esculenta* from North America. Kulkarni and Kamerath (1989) and Royse and May (1990) also compared different American *Morchella* species with this method. The aim of this work, performed on European, American, and Israeli strains, was (i) to assess the degree of isoenzymatic polymorphism at different taxonomic levels (genus, species, and intraspecific) and (ii) to evaluate isozyme polymorphism as a potential tool for experimental studies on morel biology.

Received November 10, 1995. Revision received May 2, 1996.
Accepted May 3, 1996.

D. Wipf,¹ J.-P. Bedell, and B. Botton. Laboratoire de biologie forestière, Groupe de physiologie des mycorhizes, Université Henri Poincaré, Faculté des sciences, B.P. 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

J.C. Munch and F. Buscot. Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany.

¹ Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: wipf@scbiol.u-nancy.fr).

Table 1. Designation, species, and geographic origin of fungal isolates.

Species (no. of strains)	Origin	Isolate
Monosporal strains		
<i>Gyromitra esculenta</i> (1)	1989, Rhinau, Middle-Alsace (France)	Gy
<i>Morchella esculenta</i> ₈₇ (2)	1987, Offendorf, North-Alsace (France)	A7 and B7
<i>Morchella esculenta</i> ₉₀ (2)	1990, Kreuzingen Weisweil, Baden-Württemberg (Germany)	A0 and B0
Polysporal strains		
<i>Disciotis venosa</i> (1)	1994, Beendorf Oschersleben Sachsen Anhalt (Germany)	Di
<i>Morchella conica</i> ₁₈ (1)	1992, Tel Aviv (Israel)	Co18
<i>Morchella angusticeps</i> (1)	British Columbia (Canada)	US3
Heterokaryotic strains (from <i>Morchella esculenta</i>₈₇ and <i>Morchella esculenta</i>₉₀)		
Intracarpic (2)	Laboratory crossing	A7B7 and A0B0
Intercarpic (4)	Laboratory crossing	A7B0, A7A0, B7A0, and B7B0

Table 2. List of enzymes, references, buffers, and staining methodology used for this study.

Enzyme	Ref.	Buffer	Substrate	Cofactor	Dye and catalyst
Aspartate aminotransferase	Chalot et al. 1990	0.1 M Tris-HCl (pH 8)	L-Aspartic acid	α -Ketoglutaric acid	Fast blue BB salt or fast violet blue
Glucose phosphate isomerase	Pasteur et al. 1987	0.2 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM EGTA	Fructose-6-phosphate	NADP	NBT, MTT, and PMS
Glutamine synthetase	Brun et al. 1992	50 mM Tris-HCl (pH 7.6)	L-Glutamic acid	ATP	—
NAD-glutamate dehydrogenase	Agustian et al. 1994	50 mM Tris-HCl (pH 7.6)	L-Glutamic acid	NAD	NBT and PMS
NADP-glutamate dehydrogenase	Brun et al. 1992	50 mM Tris-HCl (pH 7.6)	L-Glutamic acid	NADP	NBT and PMS
NAD-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	Pasteur et al. 1987	0.2 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM EGTA	D-Glyceraldehyde-3-phosphate	NAD	MTT and PMS
Malate dehydrogenase	Vidal et al. 1977	0.2 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM EGTA	Malic acid	NAD	NBT and PMS
Superoxide dismutase	Pasteur et al. 1987	0.2 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM EGTA	—	NAD	NBT and PMS

Note: NBT, nitroblue tetrazolium; MTT, methylthiotetrazole; PMS, phenazine methosulfate.

Materials and methods

Fungal isolates

The isozyme patterns were analyzed in several taxa (Table 1), allowing assessment of polymorphism at different systematic levels. *Gyromitra esculenta* (*Helvellaceae*) was used only as a control, since the technique is not appropriate for investigating distant relationships between *Morchellaceae* and *Helvellaceae* (Hillis and Moritz 1990). Sensitivity at the genus level was investigated by comparing *Disciotis* and *Morchella*. At the species level, two black morels (*Morchella angusticeps* and *Morchella conica*) and a yellow morel (*Morchella esculenta*) were compared. The determination of the fungal material was achieved by the strain donors. Intraspecific discrimination was assessed by screening four monosporal strains of *Morchella esculenta* and six strains were obtained by pairing these monosporal isolates. The coenocytic organization of morels does not allow assessing the heterokaryotic nature of these six strains (Berthet 1964). However, the six strains obtained by pairing monosporal isolates were considered as probably heterokaryotic on the basis of major morphological features (Buscot 1993).

All fungal isolates used are deposited in the DSM-Braunschweig (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Mascheroderweg 1b, D 38124 Braunschweig, Germany).

All isolates were cultivated in Petri dishes on solid malt extract agar (MEA) medium containing 10 g malt extract \cdot L⁻¹, 5 g glucose \cdot L⁻¹, and 20 g agar \cdot L⁻¹, and in agitated 250-mL Erlenmeyer flasks containing liquid MEA medium. In both cases, isolates were cultivated for 8 days at 25°C.

Enzymes

The investigated enzymes (Table 2) are involved in different metabolic pathways: (i) enzymes of nitrogen metabolism, such as glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2), NAD-glutamate dehydrogenase (NAD-GDH, EC 1.4.1.2), NADP-glutamate dehydrogenase (NADP-GDH, EC 1.4.1.4), and aspartate aminotransferase (AAT, EC 2.6.1.1); (ii) enzymes of carbon metabolism, such as malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37) and NAD-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPD, EC 1.2.1.12); (iii) enzymes of carbohydrate catabolism, such as glucose phosphate isomerase (GPI, EC 5.3.1.9); and

Table 3. SOD activity R_f values.

Strains	R_f			+
	0.30	0.63	0.79	
<i>Gyromitra esculenta</i>	+	+		
<i>Disciotis venosa</i>	+			
<i>Morchella conica</i> ₁₈	No revealed activity			
<i>Morchella angusticeps</i> US3				+
<i>Morchella esculenta</i> A0				+
<i>Morchella esculenta</i> B0				+
<i>Morchella esculenta</i> A7				+
<i>Morchella esculenta</i> B7	+			+
<i>Morchella esculenta</i> A0B0	+			+
<i>Morchella esculenta</i> A0A7				+
<i>Morchella esculenta</i> A0B7	+			+
<i>Morchella esculenta</i> B0A7				+
<i>Morchella esculenta</i> B0B7				+
<i>Morchella esculenta</i> A7B7				+

Table 4. NADP-GDH activity R_f values.

Strains	R_f						+
	0.15	0.17	0.20	0.22	0.24	0.29	
<i>Gyromitra esculenta</i>			+				
<i>Disciotis venosa</i>	+						
<i>Morchella conica</i> ₁₈							+
<i>Morchella angusticeps</i> US3	+						
<i>Morchella esculenta</i> A0		+					+
<i>Morchella esculenta</i> B0							+
<i>Morchella esculenta</i> A7							+
<i>Morchella esculenta</i> B7							+
<i>Morchella esculenta</i> A0B0							+
<i>Morchella esculenta</i> A0A7							+
<i>Morchella esculenta</i> A0B7							<----->
<i>Morchella esculenta</i> B0A7				+			
<i>Morchella esculenta</i> B0B7							+
<i>Morchella esculenta</i> A7B7							+

(iv) detoxification enzymes, such as superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).

Enzyme extraction

All extraction steps were carried out at 4°C. Harvested mycelia were ground with sand in a prechilled mortar in the presence of cold 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) supplemented with 10 mM sodium glutamate, 5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 2 mM EDTA, 10% v/v glycerol, 2% w/v polyvinylpyrrolidone (PVP), 10% w/w polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), and 14 mM 2-mercaptoethanol (Brun et al. 1992). The extraction ratio between buffer and fungal material was 10 μL · mg fresh weight⁻¹. After centrifugation at 13 500 × g for 30 min, the supernatant constituted the crude extract, which was used for electrophoresis. Crude extracts were stored at -75°C until electrophoretic analysis without loss of activity.

Electrophoresis

Enzymes were separated by electrophoresis under nondenaturing conditions in vertical 6% polyacrylamide slab gels (8 × 10 cm) according to Laemmli (1970) with an electrode buffer (pH 8.3) containing 6.8 mM Tris-HCl and 129 mM glycine. Electrophoresis was performed at 180 V. For nondenaturing gradient polyacrylamide gel

Table 5. GPI activity R_f values.

Strains	R_f					+
	0.25	0.71	0.73	0.76	0.80	
<i>Gyromitra esculenta</i>	+					+
<i>Disciotis venosa</i>		+				
<i>Morchella conica</i> ₁₈						+
<i>Morchella angusticeps</i> US3		+				
<i>Morchella esculenta</i> A0						+
<i>Morchella esculenta</i> B0						+
<i>Morchella esculenta</i> A7						+
<i>Morchella esculenta</i> B7						+
<i>Morchella esculenta</i> A0B0						+
<i>Morchella esculenta</i> A0A7						+
<i>Morchella esculenta</i> A0B7						+
<i>Morchella esculenta</i> B0A7						+
<i>Morchella esculenta</i> B0B7						+
<i>Morchella esculenta</i> A7B7						+

electrophoresis (PAGE), the electrode buffer (pH 8.4) contained 90 mM Tris-HCl, 80 mM boric acid, and 2.5 mM EDTA (Botton and Chalot 1991).

Staining of enzyme activities on gels

The enzyme-specific reaction mixtures containing substrates, dyes, and catalyst, as indicated by Pasteur et al. (1987), Chalot et al. (1990), Brun et al. (1992), and Agustian et al. (1994), are listed in Table 2. The relative electrophoretic mobilities (R_f) were calculated between the bromophenol blue dye front and the bands of enzyme activity. Isozymes, expressed as individual and reproducibly detected bands in the gels, were numbered sequentially from anode to cathode.

Data analysis

All gels were scanned and stored as TIFF (tagged-image file format) files and R_f values were determined using WinCam 2.0 (Cybertech, Berlin, Germany) on a PC work station. Phylogenetic information was inferred from the R_f value analysis. Dendrograms were constructed using the unweighted paired-group method of analysis (UGPMA) of Sneath and Sokal (1973) with WinCam 2.0, after establishing a Pearson's correlation matrix.

Results

Isozyme banding patterns

In all samples, GS isozyme activity was expressed as a single band (R_f 0.17) (not shown), which did not allow any discrimination. In contrast, the seven other investigated enzymes exhibited isozyme polymorphisms (Tables 3–9). All isolates were characterized by one or several well-defined migration bands, except for SOD, GADP, and NAD-GDH, for which no activity was detected for some strains (Tables 3, 6, and 7). In two cases, NADP-GDH of *Morchella esculenta* A0B7 (Table 4) and NAD-GDH of *Gyromitra esculenta* (Table 7), the activity was revealed as a large band of indeterminable length (dashed arrows).

The seven polymorphic enzymes had different discrimination potentials. The highest differentiations were obtained with the MDH (Table 8) and the AAT (Table 9 and Fig. 1), which allowed discrimination of 10 and 7 different banding patterns, respectively. Six groups were distinguished with the GAPD banding patterns (Table 6), whereas the respective isozyme

Table 6. GAPD activity R_f values.

Strains	R_f						
	0.34	0.36	0.65	0.74	0.76	0.81	0.86
<i>Gyromitra esculenta</i>	+						
<i>Disciotis venosa</i>	No revealed activity						
<i>Morchella conica</i> ₁₈		+				+	
<i>Morchella angusticeps</i> US3	No revealed activity						
<i>Morchella esculenta</i> A0	No revealed activity						
<i>Morchella esculenta</i> B0			+		+		
<i>Morchella esculenta</i> A7					+		+
<i>Morchella esculenta</i> B7			+		+		
<i>Morchella esculenta</i> A0B0	No revealed activity						
<i>Morchella esculenta</i> A0A7				+			+
<i>Morchella esculenta</i> A0B7				+			
<i>Morchella esculenta</i> B0A7			+		+		
<i>Morchella esculenta</i> B0B7			+		+		
<i>Morchella esculenta</i> A7B7			+		+		

Table 7. NAD-GDH activity R_f values.

Strains	R_f					
	0.16	0.31	0.34	0.37	0.38	0.39
<i>Gyromitra esculenta</i>	<----	----	----	---->		
<i>Disciotis venosa</i>		+				
<i>Morchella conica</i> ₁₈		+				+
<i>Morchella angusticeps</i> US3						+
<i>Morchella esculenta</i> A0					+	
<i>Morchella esculenta</i> B0			+			
<i>Morchella esculenta</i> A7					+	
<i>Morchella esculenta</i> B7						+
<i>Morchella esculenta</i> A0B0	No revealed activity					
<i>Morchella esculenta</i> A0A7					+	
<i>Morchella esculenta</i> A0B7						+
<i>Morchella esculenta</i> B0A7						+
<i>Morchella esculenta</i> B0B7						+
<i>Morchella esculenta</i> A7B7						+

Table 8. MDH activity R_f values.

Strains	R_f												
	0.21	0.27	0.28	0.33	0.36	0.37	0.38	0.39	0.42	0.45	0.46	0.50	0.78
<i>Gyromitra esculenta</i>		+							+				
<i>Disciotis venosa</i>	+						+						
<i>Morchella conica</i> ₁₈									+				
<i>Morchella angusticeps</i> US3					+			+			+		
<i>Morchella esculenta</i> A0			+					+	+				+
<i>Morchella esculenta</i> B0				+				+			+		
<i>Morchella esculenta</i> A7						+				+			
<i>Morchella esculenta</i> B7				+				+			+		
<i>Morchella esculenta</i> A0B0										+			
<i>Morchella esculenta</i> A0A7				+						+			
<i>Morchella esculenta</i> A0B7												+	
<i>Morchella esculenta</i> B0A7					+			+			+		
<i>Morchella esculenta</i> B0B7					+			+			+		
<i>Morchella esculenta</i> A7B7					+			+			+		

Fig. 1. Native gradient PAGE gel electrophoresis of AAT extracted from the studied fungal isolates. Each well was loaded with about 40 μg of proteins (crude extract). Lane 1, *Gyromitra esculenta*; lanes 2–4, *Morchella esculenta* A7B7, A7B0, and B0, respectively; lane 5, *Morchella conica*₁₈; lanes 6–14, *Morchella esculenta* B0B7, B7, A0B7, B0, A0B0, A0A7, A0, A7, and A0+A7, respectively; lane 15, *Disciotis venosa*; lane 16, *Morchella angusticeps* US3.

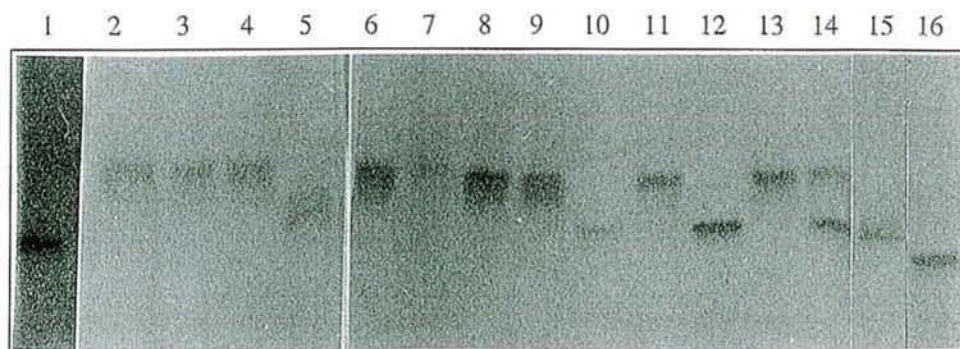


Table 9. AAT activity R_f values.

Strains	R_f						
	0.39	0.40	0.44	0.52	0.53	0.56	0.58
<i>Gyromitra esculenta</i>						+	
<i>Disciotis venosa</i>					+		
<i>Morchella conica</i> ₁₈			+	+			
<i>Morchella angusticeps</i> US3							+
<i>Morchella esculenta</i> A0				+			
<i>Morchella esculenta</i> B0	+						
<i>Morchella esculenta</i> A7	+						
<i>Morchella esculenta</i> B7		+					
<i>Morchella esculenta</i> A0B0				+			
<i>Morchella esculenta</i> A0A7	+						
<i>Morchella esculenta</i> A0B7	+						
<i>Morchella esculenta</i> B0A7	+						
<i>Morchella esculenta</i> B0B7	+						
<i>Morchella esculenta</i> A7B7	+						
<i>Morchella esculenta</i> A0 + <i>Morchella esculenta</i> A7	+			+			

activities of NADP-GDH, GPI, and NAD-GDH led to the separation of five different strain groups (Tables 4, 5, and 7 and Fig. 2). The SOD activity allowed discrimination of four groups (Table 3).

Discrimination matrix and cluster analysis

The discrimination matrix (Fig. 3), summarizing the banding patterns of all investigated enzymes, allowed separating the 4 studied strains. This matrix also provided an overview on the phylogenetic relationships between the investigated strains, as distant samples appeared to be discriminated by a higher number of enzymes. Nevertheless, this discrimination was not reliable within the samples of *Morchella esculenta*.

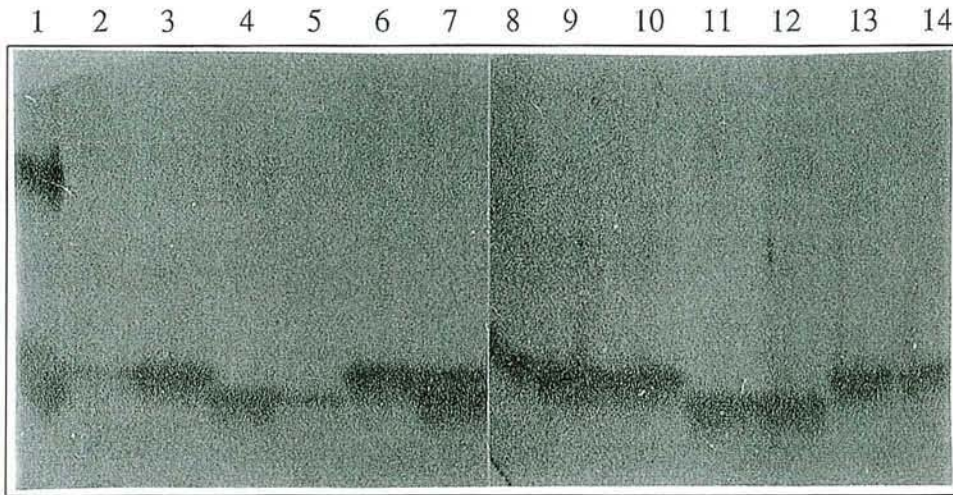
Cluster analysis based on the similarity indices for GS, GPI, IDH and AAT (detected in all strains) also allowed a clear distinction of the samples (Figs. 4 and 5). This study, from which *Gyromitra* was excluded, clearly separated *Disciotis* from *Morchella*. Within this later genus, all strains were distinguishable. However, the phylogenetic relationships were not

reflected by the degree of polymorphism. The separation of both black morels *Morchella conica* and *Morchella angusticeps* and the relationship between monosporal parents and heterokaryons in the 10 strains of yellow morels were not reflected adequately by cluster analysis.

Discussion

Under our experimental conditions, an interpretable isozyme pattern was obtained in most cases for the eight selected enzymes. With other enzymes for which the results are not presented here, the results were either negative (glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49; NADP-isocitrate dehydrogenase, EC 1.1.1.42; NAD-isocitrate dehydrogenase, EC 1.1.1.41; phosphogluconate dehydrogenase, EC 1.1.1.43) or difficult to interpret owing to the weak intensity of the bands (diaphorase, EC 1.8.1.4; fumarase, EC 4.2.1.2; pyruvate kinase, EC 2.7.1.40). This situation is consistent with the results obtained for morels by Kulkarni and Kamerath (1989)

Fig. 2. Uniform (6%) PAGE of GPI extracted from the studied fungal isolates. Each well was loaded with about 40 μg of proteins (crude extract). Lane 1, *Gyromitra esculenta*; lanes 2–6, *Morchella esculenta* A0, A0A7, A7, A0B0, and A0B7, respectively; lane 7, *Morchella conica*₁₈; lane 8, *Disciotis venosa*; lanes 9–13, *Morchella esculenta* B0, B0B7, B7, A7B7, and A7B0, respectively; lane 14, *Morchella angusticeps* US3.



and Yoon et al. (1990) or for other fungi by Dupré et al. (1993). The two culture conditions (liquid or solid medium), which determine important developmental events in morel mycelia (Buscot 1987), had no influence on the band patterns of the investigated strains.

The degree of discrimination of the eight selected enzymes was variable. For instance, GS activity did not permit any discrimination at all, whereas MDH activity allowed discrimination of 10 groups among the 14 strains studied in the present experiments.

At the genus level, the four enzymes SOD, NAD-GDH, MDH, and AAT allowed discrimination between *Disciotis* and *Morchella*. This could not be verified in the case of the GAPD for which no activity was observed in *Disciotis*.

At the species level, GAPD, MDH, AAT, and NAD-GDH could distinguish *Morchella conica* from a group including *Morchella angusticeps* and *Morchella esculenta*. Discrimination between the two latter species was achieved by analysing the polymorphism of GPI, NADP-GDH, and AAT. Similar discrimination of North American morel species was achieved using NAD-GDH and GPI by Kulkarni and Kamerath (1989).

Analysis of the respective polymorphism of GPI, MDH, GAPD, SOD, AAT, and the two GDHs was necessary to allow separation of all strains of *Morchella esculenta*. Among these enzymes, only GPI allowed characterization of the two ascocmata from which the monosporal strains A7 and B7 and A0 and B0 were obtained, respectively (see Table 1). Nevertheless, the validity of this discrimination is debatable because the heterokaryon A0B0 had the same R_f value as A7 and B7 for this enzyme. Polymorphism of the MDH enzyme has been demonstrated to be adequate for separating isolates of *Trichosporon beigelii* (Kemker et al. 1991). However, it did not allow interspecific discrimination in *Suillus* (Keller 1992). In the present study, this enzyme appeared to offer the highest resolution, distinguishing seven groups within the 10 strains of *Morchella esculenta*. Five of these seven groups contained only one strain.

The migration patterns of this enzyme permitted differentiation between all presumed heterokaryons and their respective parents. Together with those of Roux and Labarere (1990), who characterized dikaryotic strains in *Agaricus bitorquis* by analysis of the polymorphism of alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1), these results demonstrate that isozyme analyses are suitable for characterization of heterokaryons.

In the cluster analysis based on the similarity index of four enzymes (Fig. 5), the percentage of polymorphism within the investigated *Morchellaceae* ranged from 3 to 80%. Yoon et al. (1990) reported 50% of polymorphism and Royle and May (1990) reported 80% of polymorphism in morel species and geographical populations with 12 and 16 enzymes, respectively. In a serological comparison, *Morchella esculenta* and *Mitrophora semilibera* exhibited a polymorphism of 27% (Jung et al. 1993). PCR-RFLP analyses of the 28S ribosomal RNA gene of different *Morchellaceae* revealed a polymorphism ranging from 0.5 to 1.5% (Bunyard et al. 1995). Investigations on morel DNA were also performed with polymerase chain reaction – restriction fragment length, polymorphism (PCR-RFLP) of the ribosomal DNA spacers and with microsatellite-primed PCR (Buscot et al. 1996). Cluster analysis of results obtained with the latter technique showed a polymorphism ranging from 2% between monosporal strains of the same ascocoma to 20% at the genus level (F. Buscot and D. Wipf, unpublished data). Gessner (1995) emphasized the difficulty to improve systematics or geographic and phenotypic variations in morels with these different sources of polymorphism.

The present study demonstrates that the high enzyme polymorphism allowed distinguishing strains without any ambiguity in agreement with previous works (Gessner et al. 1987; Yoon et al. 1990; Royle and May 1990). In particular, it was useful to confirm the heterokaryotic nature of the cultures issued from nonself confrontations of monosporal isolates (Buscot 1993). However, this polymorphism only corroborates the phylogeny of the investigated strains at high taxonomical

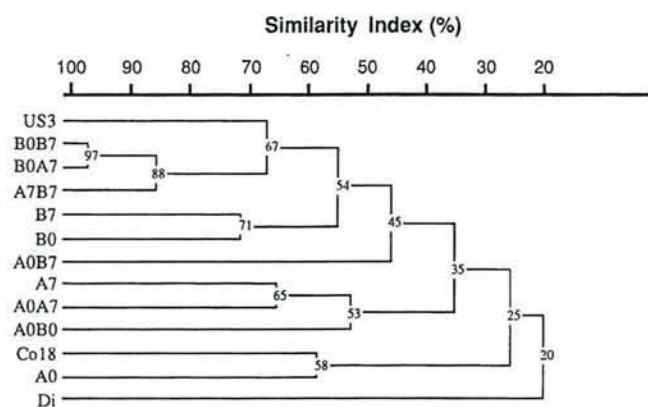
Fig. 3. Isozymes allowing discrimination of the studied strains. Absence of activity found with SOD (Co18), GAPD (Di, US3, A0, and A0B0), NAD-GDH (A0B0), as well as diffuse banding patterns exhibited by NADP-GDH (A0B7) and NAD-GDH (gyro), were not included as results to construct this matrix. NADP-GDH and NAD-GDH are abbreviated as GDH1 and GDH2, respectively.

<i>Morchella esculenta</i> A0															
<i>Morchella esculenta</i> A0A7	GDH1 MDH AAT														
<i>Morchella esculenta</i> A0B0	SOD GDH1 GPI MDH	SOD GPI MDH AAT													
<i>Morchella esculenta</i> A0B7	SOD GDH2 MDH AAT	SOD GAPD GDH2 MDH	GPI MDH AAT												
<i>Morchella esculenta</i> A7	GDH1 GPI MDH AAT	GPI GAPD MDH	SOD MDH AAT	SOD GPI GAPD GDH2 MDH											
<i>Morchella esculenta</i> A7B7	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH	SOD MDH AAT	SOD GPI GAPD MDH	GAPD GDH2 MDH										
<i>Morchella esculenta</i> B0	GDH1 GDH2 MDH AAT	GAPD GDH2 MDH	SOD GPI MDH AAT	SOD GAPD GDH2 MDH	GPI GAPD GDH2 MDH	GPI GDH2									
<i>Morchella esculenta</i> B0A7	GDH1 GDH2 MDH AAT	GDH1 GAPD GDH2 MDH	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GDH1 GAPD MDH	GDH1 GPI GAPD GDH2 MDH	GDH1 GPI	GDH1 GDH2 MDH								
<i>Morchella esculenta</i> B0B7	GDH1 GDH2 MDH AAT	GAPD GDH2 MDH	SOD GPI MDH AAT	SOD GAPD MDH	GPI GAPD GDH2 MDH	GPI	GDH2 MDH	GDH1							
<i>Morchella esculenta</i> B7	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GPI GAPD GDH2 MDH AAT	MDH AAT	GPI GAPD MDH AAT	SOD GAPD GDH2 MDH AAT	SOD MDH AAT	SOD GPI GDH2 AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GPI MDH AAT						
<i>Morchella conica</i> Co18	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT	GPI GAPD GDH2 MDH AAT				
<i>Disciotis venosa</i> Di	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT			
<i>Morchella angusticeps</i> US3	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GDH1 GPI AAT	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	GDH1 GPI AAT	GDH1 GPI AAT	GDH1 GPI AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	GDH1 GPI GDH2 MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT		
<i>Gyromitra esculenta</i> Gyro	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI GAPD MDH AAT	GDH1 GPI GAPD MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	SOD GDH1 GPI MDH AAT	
	A0	A0A7	A0B0	A0B7	A7	A7B7	B0	B0A7	B0B7	B7	Co18	Di	US3	Gyro	

Fig. 4. Distance matrix calculated by Pearson's correlation and based on banding patterns for enzymes that appeared in all strains, i.e., GS, GPI, MDH, and AAT.

A 0														
A 0 A 7	28													
A 0 B 0	38	44												
A 0 B 7	33	60	24											
A 7	14	65	61	46										
A 7 B 7	10	38	29	44	49									
B 0	26	58	18	61	40	61								
B 0 A 7	29	53	18	61	39	84	74							
B 0 B 7	23	51	16	58	39	88	72	97						
B 7	11	31	34	26	35	59	71	45	46					
Co 18	59	29	58	35	30	24	27	29	24	28				
Di	12	15	19	41	35	13	13	14	12	14	22			
US 3	9	16	16	23	19	67	38	66	67	42	10	28		
	A 0	A 0 A 7	A 0 B 0	A 0 B 7	A 7	A 7 B 7	B 0	B 0 A 7	B 0 B 7	B 7	Co 18	Di	US 3	

Fig. 5. Phylogenetic relationships of the *Morchellaceae*. The phylogenetic tree is based on data shown in Fig. 4 and was constructed using the UPGMA method (Sneath and Sokal 1973), within the computer program WinCam 2.0.



levels (genus or family). The impossibility to separate adequately both investigated black morels *Morchella conica* (Co18) and *Morchella angusticeps* (US3) from the strains of *Morchella esculenta* (yellow morel) by isozyme pattern might be due to the respective geographical origin of the samples,

although their discrimination with PCR was more in accordance with the morel systematics (Buscot et al. 1996). Similarly, discrimination matrix and cluster analysis of the isozymes did not reflect the relationship between the monosporal parents of *Morchella esculenta* and the product of their dual confrontations, which could be better assessed with the microsatellite-primed PCR (F. Buscot and D. Wipf, unpublished data).

The present study confirms the findings that morels can exhibit higher isozyme variations at intraspecific than at interspecific level. Therefore, isozymes patterns should be used with caution when trying to improve systematics of the genus *Morchella*. This is illustrated by the fact that isozyme analyses have led to consider *Morchella esculenta* and *Morchella deliciosa* as separated species (Gessner et al. 1987) and later as being conspecific (Yoon et al. 1990). On the other hand, similar discrepancies are observed in clusters established on the basis of restriction analyses of the 28S ribosomal RNA in *Morchellaceae* (Bunyard et al. 1994, 1995). In a recent review of the different analyses performed on North American morels, Gessner (1995) suggested that only few species with considerable phenotypic variations exist in morels. These variations are to relate to the high ecophysiological plasticity exhibited by the fungus under laboratory (Buscot 1993) and field (Buscot 1992) conditions. The question arises whether the species concept of the genus *Morchella* is questionable as suggested by Berthet

(1964) or whether polymorphic markers suitable for improving morel systematics remain to be discovered.

Acknowledgements

This work was performed in the framework of a German-French PROCOPE cooperation project. We are indebted to our colleagues H. Boyle (Braunschweig) and M. Chalot (Nancy) who kindly revised the manuscript.

References

- Agustian, A., Mohammed, C., Guillaumin, J.J., and Botton, B. 1994. Discrimination of some african *Armillaria* species by isozyme electrophoretic analysis. *New Phytol.* **128**: 135-143.
- Berthet, P. 1964. Essais biotaxonomique sur les discomycètes. Thèse d'état, Faculté des sciences de Lyon, Lyon, France.
- Botton, B., and Chalot, M. 1991. Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. In *Experiments with mycorrhizas, séries: methods in microbiology*. Edited by J.R. Norris, D.J. Read, and A.K. Varma. Vol. 23. Academic Press, New York. pp. 203-252.
- Boudier, E. 1897. Révision analytique des morilles de France. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **13**: 194-217.
- Brun, A., Chalot, M., Martin, F. and Botton, B. 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiol.* **99**: 938-944.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S., and Royle, D.J. 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia*, **86**: 762-772.
- Bunyard, B.A., Nicholson, M.S., and Royle, D.J. 1995. Phylogenetic resolution of *Morchella Verpa* and *Disciotis* [Pezizales: *Morchellaceae*] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal gene. *Exp. Mycol.* **19**: 223-233.
- Buscot, F. 1987. Contribution à l'étude d'une espèce de morille de la forêt du rhénane: *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier; perspectives de domestication. Thèse d'état, Université de Strasbourg, Strasbourg, France.
- Buscot, F. 1992. Stratégies écologiques et biologiques des morilles. *Cryptogam. Mycol.* **13**: 171-179.
- Buscot, F. 1993. Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.* **97**: 136-140.
- Buscot, F., Wipf, D., Di Battista, C., Munch, J.C., Botton, B., and Martin, F. 1996. DNA polymorphism in morels. I: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycol. Res.* **100**: 63-71.
- Chalot, M., Brun, A., Khalid, A., Dell, B., Rohr, R., and Botton, B. 1990. Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in spruce and beech ectomycorrhizas. *Can. J. Bot.* **68**: 1756-1762.
- Dupré, C., Chevalier, G., Palenzona, M., and Biocca, E. 1993. Caractérisation des mycorrhizes de différents *Tuber* par l'étude du polymorphisme enzymatique. *Cryptogam. Mycol.* **4**: 163-170.
- Gessner, R.V. 1995. Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. *Can. J. Bot.* **73**: (1): 967-972.
- Gessner, R.V., Romano, M.A., and Schultz, R.W. 1987. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia*, **79**: 683-687.
- Hervey, A., Bistig, G., and Leong, I. 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia*, **70**: 1269-1274.
- Hillis, D.M., and Moritz, C. 1990. *Molecular systematics*. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Jacquetant, E. 1984. Les Morilles. Plantanida, Lausanne, Switzerland.
- Jung, S.W., Gessner R.V., Keudell, K.C., and Romano M.A. 1993. Systematics of *Morchella esculenta* complex using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycologia*, **85**: 677-684.
- Keller, G. 1992. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. *New Phytol.* **120**: 351-358.
- Kemker, B.J., Lehmann, P.F., Lee, J.W., and Walsh, T.J. 1991. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigelii* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 1677-1683.
- Korf, R.P. 1972. Synoptic key of the genera of the *Pezizales*. *Mycologia*, **64**: 937-993.
- Kulkarni, R., and Kamerath, G.D. 1989. Isozyme analysis of *Morchella* species. *Mushroom Sci.* **12**: 451-457.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**: 680-685.
- Magae, Y., Haga, K., Taniguchi, H., and Sasaki, T. 1990. Enzymes of strains of *Pleurotus* species (*Basidiomycetes*) compared by gel electrophoresis. *J. Genet. Appl. Microbiol.* **36**: 69-80.
- Oudemans, P., and Coffey, M.D. 1991. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of *Phytophthora*. *Mycol. Res.* **95**: 19-30.
- Ower, R., Mills, G.L., and Malachowski, J.A. 1986. Cultivation of *Morchella*. U.S. patent 4: 594, 809.
- Pasteur, N., Pasteur, G., Bonhomme, F., Catalan, J., and Britton-Davidian, J. 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Tec & Doc Lavoisier, Paris. pp. 78-145.
- Roux, P., and Labarere, J. 1990. Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible Basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). *Exp. Mycol.* **14**: 101-112.
- Royle, D.J., and May, B. 1990. Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. *Biochem. Syst. Ecol.* **18**: 475-479.
- Sneath P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, Calif.
- Vidal, J., Gadal, P., Cavalie, G., and Cailliau-Commanay, L. 1977. NADH and NADPH dependent malate dehydrogenase of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* **39**: 190-195.
- Volk, T.J., and Leonard, T.J. 1989. Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoascospore strains of *Morchella*. *Mycologia*, **81**: 523-531.
- Yoon, C.S., Gessner, R.V., and Romano, M.A. 1990. Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia*, **82**: 227-235.

Chapitre V: Polymorphisme génomique



5.1 PCR des microsatellites et polymorphisme de l'ADN_r

Publication n°3

DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR.

Buscot, F., D. Wipf, C. Di Battista, J.C. Munch, B. Botton & F. Martin (1996)
Mycological Research **100**, 63-71

Ce travail constitue une deuxième étape dans le développement d'un outil moléculaire permettant de préciser la systématique et la notion d'espèce chez les morilles et d'assurer le suivi des populations de noyaux dans des mycéliums hétérocaryotiques obtenus expérimentalement. En complément de l'étude précédente, le travail a cette fois porté sur la caractérisation du polymorphisme de l'ADN sur un ensemble de souches plus important (Publication 3, Tab. 1).

Sur ce matériel, deux types de PCR de sensibilité différente ont été pratiquées:

(i) PCR des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) et IGS (Intergenic Spacer) de l'ADN ribosomal, couplée à des restrictions enzymatiques (RFLP);

(ii) PCR aléatoire avec les amorces complémentaires des séquences satellites (GACA)₄ et (GTG)₅.

Alors que l'amplification correcte de la région IGS n'a été possible que chez les morilles jaunes *M. esculenta* et *M. crassipes* ainsi que chez *Disciotis venosa*, celle de la région ITS a été obtenue pour l'ensemble des souches étudiées. La combinaison de l'analyse de la longueur des amplifiats de l'ITS et des fragments obtenus après sa restriction par *Eco*RI/*Rsa*I a permis de séparer la quasi totalité des taxons étudiés. Seules *Morchella esculenta* et *M. crassipes* au sein des morilles jaunes, ainsi que *M. conica* et *M. angusticeps* chez les morilles noires n'ont pu être séparées. La différence de longueur de la région ITS entre ces deux groupes d'espèce du genre *Morchella* (environ 400 pb) doit être soulignée. Pour la PCR aléatoire, seule l'amorce (GTG)₅ a conduit à une amplification satisfaisante. Les profils électrophorétiques d'environ 25 bandes ont permis la discrimination de toutes les espèces étudiées et, chez *M. esculenta*, de séparer une souche américaine des souches européennes. Par contre, le polymorphisme observé s'est révélé insuffisant pour caractériser les différents hétérocaryons de *M. esculenta*.

Au total, aucune des techniques PCR utilisées ne s'est avérée aussi discriminante que les analyses isoenzymatiques pour caractériser les souches. Néanmoins, le polymorphisme de la région ITS est apparu comme adapté à l'étude de la systématique des morchellacées. Les quelques cas ambigus cités plus haut illustrent la difficulté de définir une notion d'espèce au sein du genre *Morchella*.

DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR

FRANÇOIS BUSCOT¹*, DANIEL WIPF², CÉLINE DI BATTISTA³, JEAN-CHARLES MUNCH¹,
BERNARD BOTTON² AND FRANCIS MARTIN³

¹ Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany

² Université Henri Poincaré, Laboratoire de Biologie Forestière, Unité de Physiologie Mycorhizienne, BP 239, F-54506, Vandœuvre-les-Nancy, France

³ Equipe de Microbiologie Forestière, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches de Nancy, F-54280, Champenoux, France

As a part of investigations on heterokaryon formation in morels, a characterization of DNA polymorphism within this fungal group was attempted. In order to assess which discrimination level is necessary to trace nucleus populations in heterokaryons, but also in the context of the debatable species definition in morels, different taxa and strain types (monosporal and heterokaryons) were analysed with two polymerase chain reaction (PCR) techniques of distinct sensitivity: (i) PCR of the internal transcribed spacer (ITS) and the intergenic spacer (IGS) of the ribosomal nuclear DNA coupled with restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, (ii) microsatellite-primed PCR. The ITS and IGS PCR/RFLP appeared at first to be adequate to assess morel systematics. The microsatellite-primed PCR with the primer (GTG)₆ revealed, however, that morels exhibit less intraspecific DNA polymorphism than other ascomycetes. Based upon these results, two strategies for investigating somatic strain interactions within morels using DNA analyses are proposed.

Morels grow under a wide range of natural or man made conditions which can be classified into two distinct ecological strategies: (i) ephemeral, saprotrophic fungi on recently disturbed soils characterised by a high nutrient availability and a low competition pressure; (ii) perennial mutualistic fungi in stabilized ecosystems with high competition for nutrients (Buscot, 1992). This ecological plasticity is uncommon in ascomycetes but not unusual within the highly evolved order of the Pezizales to which morels belong (Petersen, 1985). It coincides with their coenocytic nature (Berthet, 1964), and with polyploidy (Weber & Bresinsky, 1992), two features that poorly compensate the genetic disadvantage of the monokaryotic state in which ascomycetes undergo the greatest part of their life cycle.

Rayner (1991) has discussed another frequent strategy for reinforcing genetic potential in ascomycetes and basidiomycetes. This consists of pooling nuclei of different strains in a heterokaryotic mycelium after formation of vegetative anastomoses. Such somatic interactions have been described in morels by Volk & Leonard (1989), who obtained heterokaryotic mycelia with reduced growth potential by non-self confrontation of monosporal strains. Buscot (1993) showed that if such confrontations are performed on nitrogen deficient media, homogeneous and vigorously growing colonies with reinforced morphological potential develop. Studies of the

isoenzymatic pattern of such colonies indicated their heterokaryotic nature (Wipf, personal communication). Buscot (1992) hypothesized that the duality of mycelial interactions in morels according to the nutritive context could be related to their two distinct ecological strategies in nature.

Further investigations of somatic mycelial interactions in morels require a diagnostic tool which enables characterization of monosporal strains and to survey the populations of nuclei in heterokaryons. For this purpose, characterization of nuclear DNA itself is necessary. However, a prerequisite to this is the evaluation of DNA polymorphism in morels through screening several taxa by methods with different sensitivity. This preliminary is justified because DNA polymorphism in morels was only investigated on the 28S ribosomal RNA gene of few species (Bunyard, Nicholson & Royse, 1994). Furthermore, species definition in morels is controversial (Berthet, 1964; Bresinsky, Glaser & Stangl, 1972; Korf, 1973).

The polymerase chain reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1988) coupled to restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) is now widely used in fungal taxonomy (White *et al.*, 1990; Bruns, White & Taylor, 1991) and is currently used to identify ectomycorrhizal species in both ascomycetes and basidiomycetes (Gardes *et al.*, 1991; Henrion, Le Tacon & Martin, 1992; Henrion, Chevalier & Martin, 1994). In this method, PCR primers based on conserved regions of ribosomal DNA (rDNA) are used to amplify two highly polymorphic non-coding regions, the internal transcribed (ITS) and the intergenic (IGS) spacers.

* Corresponding author.

Table 1. Nature and geographical origin of the mycelial isolates

Species (no. of strains)	Origin	Abbreviation
Monosporal strains		
<i>Mitrophora semilibera</i> 1 (1)	Schöntal Aschhausen, Baden-Württemberg (Germany)	Mi1
<i>Mitrophora semilibera</i> 2 (1)	Weimear, Thüringen (Germany)	Mi2
<i>Gyromitra esculenta</i> (1)	Rhinau, MiddleAlsace (France)	Gy
<i>Verpa conica</i> (1)	Schöntal Aschhausen, Baden-Württemberg (Germany)	Ve
<i>Morchella esculenta</i> ₈₇ (2)	Offendorf Northern-Alsace (France)	A7 B7
<i>Morchella esculenta</i> ₉₀ (2)	Kreuzingen Weisweil, Baden-Württemberg (Germany)	A0 B0
Polysporal strains		
<i>Disciotis venosa</i> (1)	Beendorf, Sachsen Anhalt (Germany)	Di
<i>Morchella conica</i> ₁₈ (1)	Northern Israel	Co16
<i>Morchella conica</i> ₁₈ (1)	Tel Aviv (Israel)	Co18
<i>Morchella angusticeps</i> fungi perfecti U.S.A. (1)	(U.S.A.)	AnUS
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785 (1)	(U.S.A.)	MoUS
<i>Morchella angusticeps</i> PennState 198 (1)	British Columbia (Canada)	AnCan
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277 (1)	(U.S.A.)	CrUS
<i>Morchella esculenta</i> ₈₇ (1)	Offendorf, Northern-Alsace (France)	Mo24 ₂
Heterokaryotic strains*		
Intracarpic (2)		A7B7 A0B0
Intercarpic (4)		A7B0 & A7A0 B7A0 & B7B0

* Pairing of monosporal strains of *Morchella esculenta*₈₇ with *M. esculenta*₉₀. The first column refers to the pairing type (no. of strains).

PCR with single primers of arbitrary sequence allows analysis of polymorphism on the whole genomic DNA in absence of information on nucleotide sequences (Welsh & McClelland, 1990). This method, called random amplification of polymorphic DNA markers (RAPD) or PCR-fingerprinting is adequate for investigations at the intraspecific level, but requires careful optimization (Growhurst *et al.*, 1991). A more reproducible PCR-fingerprinting technique uses single primers which were originally designed as hybridization probes for detection of mini- or microsatellite DNA in conventional DNA fingerprinting in order to amplify different sectors of the DNA of eukaryotes (Meyer *et al.*, 1992; Schönian *et al.*, 1993). Complementary sites for the oligonucleotides (GACA)₄ and (GTG)₅ could be detected in fungi (Meyer *et al.*, 1992; Costa & Martin, 1995).

The present work constitutes a preliminary step towards future detailed studies on behaviour of populations of nuclei in heterokaryotic mycelia in morels. Its aim was to achieve a first evaluation of DNA polymorphism in this group by screening different taxa and types of isolates with PCR-methods of distinct sensitivity (i) PCR/RFLP of the ITS and IGS regions, (ii) microsatellite primed-PCR with the single primers (GTG)₅ and (GACA)₄.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates

The investigated taxa were *Gyromitra esculenta* (Pers.: Fr.) Fr. (Helvellaceae) and *Disciotis venosa* (Pers.: Fr.) Boud., *Verpa*

conica (O. F. Müll.: Fr.) Swartz, *Mitrophora semilibera* (DC.: Fr.) Lév., *Morchella conica* Pers., *Morchella angusticeps* (Peck) Boud., *Morchella esculenta* (L.: Fr.) Pers., *Morchella crassipes* (Krombh.) Boud. (Morchellaceae). The geographic origin and the nature of the analysed material (monosporal, polysporal and heterokaryotic isolates) are listed in Table 1. All isolates were derived from spore germinations as described by Buscot (1993). The heterokaryons were obtained by pairing monospore isolates of the same (intracarpic) or of different (intercarpic) ascocmata of *M. esculenta* on a nitrogen-deficient medium stabilising the crossings (Buscot, 1993).

Culture of the strains and DNA extraction

The strains were cultivated for 4–5 d in darkness, at 25 °C, under vigorous agitation, in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of a malt extract (10 g l⁻¹) glucose (5 g l⁻¹) liquid medium. The mycelial pellets were harvested by filtration, washed twice with sterile distilled water and immediately analysed.

Total DNA was extracted from a few mg of fresh material according to the procedure of Henion *et al.* (1994), resuspended in 50 µg of 10 mM-Tris-HCl buffer (pH) containing 2.5 mM EDTA and stored at 4° until use.

PCR amplification and RFLP analysis of the ITS and IGS regions

The sequence of the oligonucleotide primers used to amplify the ITS and the IGS regions of the rDNA have been described

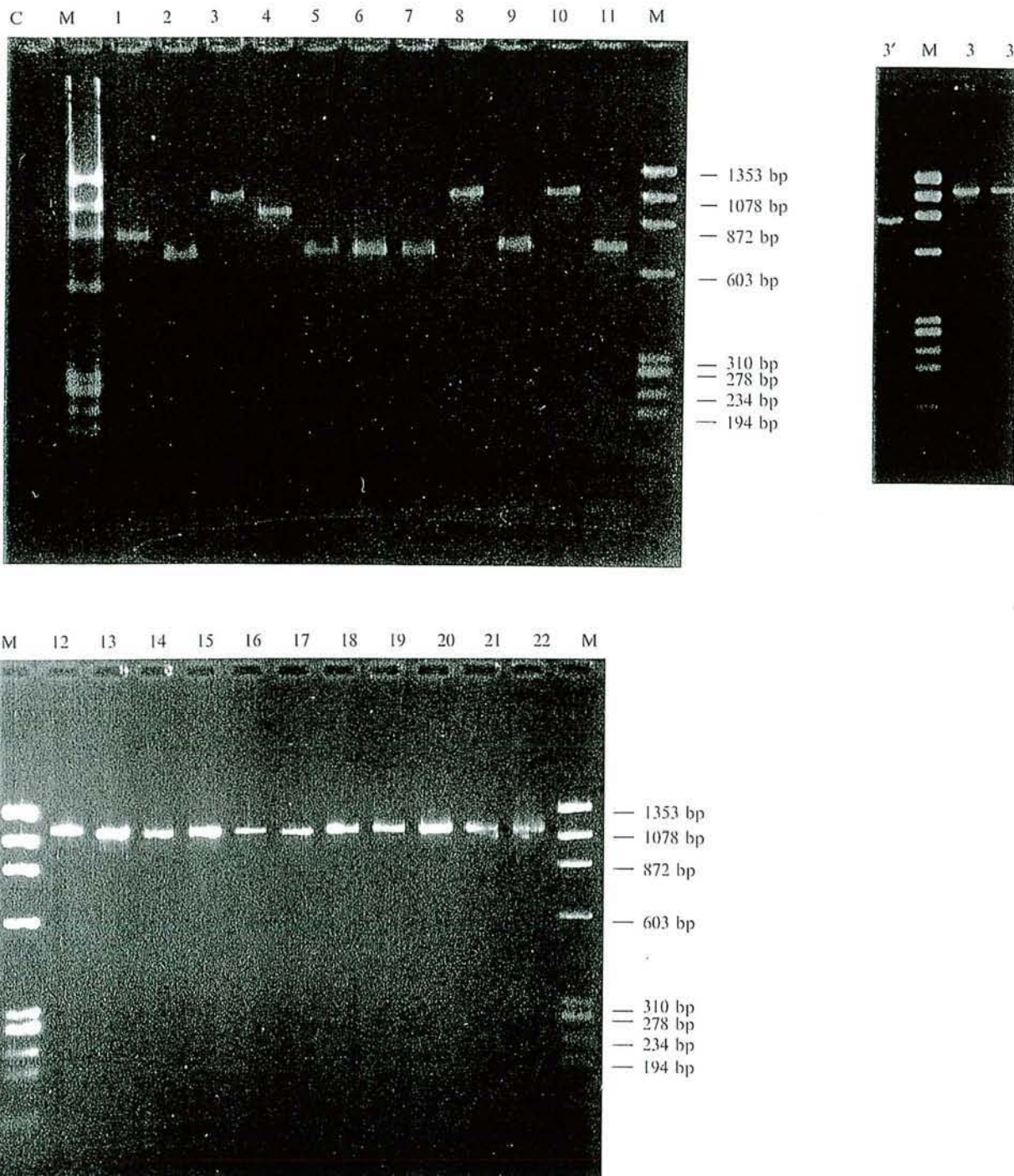


Fig. 1. Agarose electrophoresis gel of the rDNA spacer ITS of different Helvellaceae and Morchellaceae. C., control; M, fragment size markers (Φ X174 digested by *Hae* III); 1, *Gyromitra esculenta*; 2, *Verpa conica*; 3 & 12, *Morchella esculenta* Mo24; 3', *Mitrophora semilibera* 1; 4, *Disciotis venosa*; 5, *Morchella conica*₁₆; 6, *M. conica*₁₈; 7 & 11, *Morchella angusticeps* AnUS; 8, *M. esculenta* MoUS; 9, *M. angusticeps* AnCan; 10, *Morchella crassipes*; 13–22, *M. esculenta* (13, A7; 14, B7; 15, A0; 16, B0; 17, A7B7; 18, A0A7; 19, B0A7; 20, A0B7; 21, B0B7; 22, A0B0).

by Henrion *et al.* (1992). The primers ITS1 and ITS4 allow amplification of the ITS region, plus a small portion of the 3' end of the 17S-rDNA and of the 5' end of the 25S-rDNA, respectively corresponding to the primer regions. The primers CNL12 and 5SA allow amplification of a portion of the proximal IGS region delimited by the 3' end of the 25S and the 5' end of the 5S-rDNA sequences. These primers were synthesized and supplied by MWG-BIOTECH (Ebersberg,

Germany). The PCR procedure was similar to that described by Henrion *et al.* (1994). Briefly, the reactants for amplification were combined in 0.5 ml polypropylene tubes to give a net volume of 100 μ l and concentrations of: 10 mM-Tris-HCl (pH 8.8 at 25 $^{\circ}$), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X100, 0.1% gelatine, 20 pmol of each set of relevant unpurified primers, 200 μ M each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP and 0.05 to 0.5 ng DNA template (50 μ l of 20 to 1000-fold water

dilution of the DNA extract). Following this, 2.5 units of Taq DNA polymerase (Amersham, RPN 0303Z) were added to the tube content which was overlaid with two droplets of mineral oil (Sigma, M-5904).

The charged tubes were immediately placed into an 'OmniGene' (Hybaid) thermocycler functioning under tube temperature control mode. The thermal cycling parameters were an initial denaturation at 94° for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94° for 40 s, annealing at 50° for 40 s, and extension at 72° for 40 s with final extension at 72° for 10 min. Controls without DNA were made to rule out the presence of contaminants in the reagents and reaction buffers.

Two-thirds of the amplified DNA were digested for 1 h with 5 units of (*Hinf* I, *Eco*R I, *Rsa* I) (Biolabs) according to the manufacturers instructions. The products of amplification and the restriction fragments were size-fractionated using a 2% agarose gel (Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989). Agarose gels were stained with ethidium bromide, and photographed under uv light. According to the range of length of the analysed fragments, different DNA size standards (Boehringer) were used (λ DNA digested by *Eco*RI and *Hind* III; pBR328DNA digested by *Bgl* I and pBR328 DNA digested by *Hinf* I; pUCBM21 digested by *Hpa* II and pUCBM21 digested by *Dra* I and *Hind* III; ϕ X174 digested by *Hae* III).

Microsatellite-primed PCR

The primers (GTG)₅ and (GACA)₄ were synthesized and supplied by MWG-BIOTECH (Ebersberg, Germany). The amplification mixture was proportionally the same as in the ITS and IGS PCR, the reaction volume being reduced here to 50 μ l. The thermal cycling parameters were an initial denaturation at 94° for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94° for 40 s, annealing at 62° for 1 min and extension at 72° for 1 min with final extension at 72° for 10 min. The products of amplification were size-fractionated using a polyacrylamide electrophoresis gel consisting of a 5% stacking gel and a 10% running gel. The migration was performed at a constant voltage (500 V). The gels were silver stained according to the procedure of Bassam, Caetano-Anollés & Gresshoff (1991) as modified by Schwieger (pers. communication).

Fragment size

All gels were recorded using a CCD camera (Cybertech, Berlin, Germany) and stored as TIFF-files. Fragment size was determined using WinCam 2.0 (Cybertech) on a PC workstation.

Number of replicates and control of the results

In all assays, three replicates were performed for each step of the procedure. Partial sequencing of the ITS and IGS PCR products of *M. esculenta* was performed, confirming the amplification of the target sequences of the rDNA (data not shown).

RESULTS

Polymorphism of the internal transcribed spacer

The PCR amplification of the ITS region was successful for all investigated samples (Fig. 1). Based upon the length of the unique fragment amplified from these samples, five groups of strains could be identified (Table 2): (i) *Verpa* and all isolates of both *M. conica* and *M. angusticeps*, (ii) both *Mitrophora* strains; (iii) *Gyromitra esculenta*; (iv) *Disciotis venosa*; (v) all strains of *M. esculenta* and *M. crassipes*. The four or five band patterns obtained after restriction of the amplified ITS fragments (Fig. 2) with the endonuclease combination *Eco*RI/*Rsa*I only allowed the additional discrimination of *V. conica* within the first group (Table 3).

Polymorphism of the intergenic spacer

Under the standard reaction conditions, the IGS PCR gave reproducible multiple band patterns for all samples (data not shown). When the Taq polymerase was added after the initial DNA denaturation (hot start procedure) as described by Innis & Gelfand (1990), simple amplification bands were obtained for *Disciotis venosa*, all strains of *M. esculenta* and *M. crassipes* (Fig. 3, Table 4). Attempts to obtain only one amplification fragment were performed for the other strains. They included variation of the hybridization temperature (50°–58°), the

Table 2. Length polymorphism of the rDNA spacer ITS in different Morchellaceae and one Helvellaceae

	Fragments size (bp)				
	744	826	856	1107	1150
<i>Gyromitra-esculenta</i>			+		
<i>Verpa conica</i>	+				
<i>Mitrophora semilibera</i> 1		+			
<i>Mitrophora semilibera</i> 2		+			
<i>Disciotis venosa</i>				+	
<i>Morchella conica</i> ₁₆	+				
<i>Morchella conica</i> ₁₈	+				
<i>Morchella angusticeps</i>	+				
fungi perfecti USA					
<i>Morchella esculenta</i>					+
ATCC 32785					
<i>Morchella angusticeps</i>	+				
PennState 198					
<i>Morchella crassipes</i>					+
ATCC 13277					
<i>Morchella esculenta</i>					
Mo 24 ₂					+
A7					+
B7					+
A0					+
B0					+
A7B7					+
A0A7					+
B0A7					+
A0B7					+
B0B7					+
A0B0					+

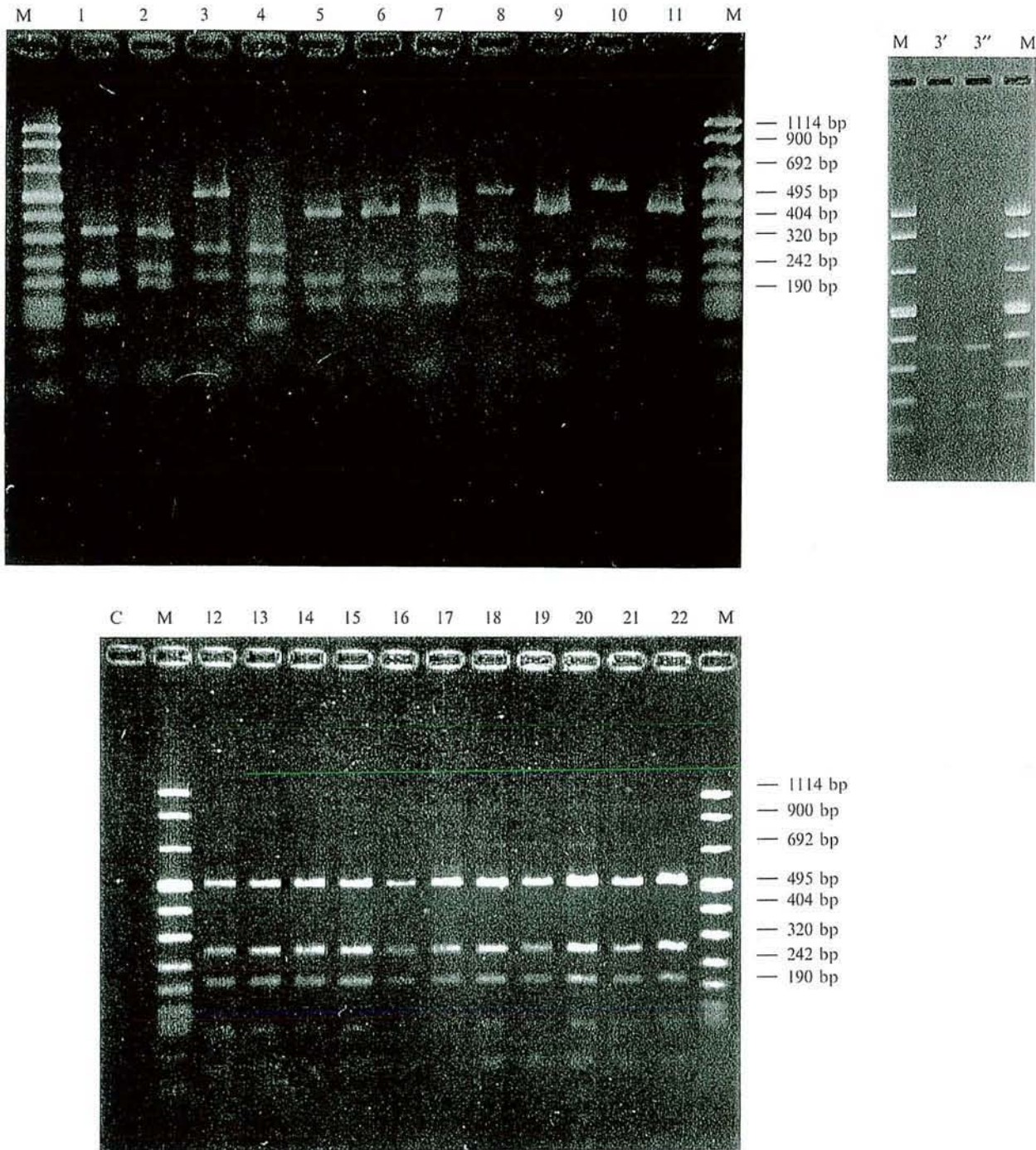


Fig. 2. Agarose electrophoresis gel of the restriction fragments of the rDNA spacer ITS in different *Helvellaceae* and *Morchellaceae* digested by the restriction enzymes *EcoR* I and *Rsa* I. C, control; M, fragment size markers (pUCBM 21 digested by *Hpa* II & pUCBM 21 digested by *Dra* I and *Hind* III); 1, *Gyromitra esculenta*; 2, *Verpa conica*; 3 & 12, *Morchella esculenta* Mo24; 3' *Mitrophora semilibera* 1; 3'', *Mitrophora semilibera* 2; 4, *Disciotis venosa*; 5, *Morchella conica*₁₆; 6, *M. conica*₁₈; 7 & 11, *Morchella angusticeps* AnUS; 8, *M. esculenta* MoUS; 9, *M. angusticeps* AnCan; 10, *Morchella crassipes*; 13–22, *M. esculenta* (13, A7; 14, B7; 15, A0; 16, B0; 17, A7B7; 18, A0A7; 19, B0A7; 20, A0B7; 21, B0B7; 22, A0B0).

primers concentration (0.05–2 μM) and the MgCl₂ concentration (0.5–2.5 mM) or the addition of the 32nd gene protein of the T4 phage (Panaccio & Lew, 1991). The latter factor led to a partial reduction of the number of multiple bands.

Restriction of the IGS region with the endonuclease *Hinf* I was performed in the cases for which only one fragment had been obtained after the PCR, i.e. *D. venosa*, all strains of

M. esculenta and *M. crassipes*. This restriction analysis allowed the discrimination of *M. crassipes* from *M. esculenta* (Fig. 4, Table 5).

DNA fingerprints using microsatellite-primed PCR

Although different annealing temperatures from 50–67° were tested, no amplification was obtained with the primer

Table 3. Restriction fragments analysis of the rDNA spacer ITS digested with *EcoR* I + *Rsa* I in one Helvellaceae and in several Morchellaceae

	Fragments size (bp)										
	110	119	160	190	203	226	285	343	360	411	519
<i>Gyromitra esculenta</i>		+			*			+			
<i>Verpa conica</i>				+		+		+			
<i>Mitrophora semilibera</i> 1				+		+			+		
<i>Mitrophora semilibera</i> 2				+		+			+		
<i>Disciotis venosa</i>		+	+		*		+				
<i>Morchella conica</i> ₁₆			+		+					+	
<i>Morchella conica</i> ₁₈			+		+					+	
<i>Morchella angusticeps</i> fungi perfecti USA			+		+					+	
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785	+				+		+				+
<i>Morchella angusticeps</i> PennState 198			+		+					+	
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277	+				+		+				+
<i>Morchella esculenta</i> Mo 24 ₂	+				+		+				+
A7	+				+		+				+
B7	+				+		+				+
A0	+				+		+				+
B0	+				+		+				+
A7B7	+				+		+				+
A0A7	+				+		+				+
B0A7	+				+		+				+
A0B7	+				+		+				+
B0B7	+				+		+				+
A0B0	+				+		+				+

* Because of the high intensity or brightness of their electrophoretic band (see Fig. 2), the products marked with a star probably correspond to double fragments.

(GACA)₄. In contrast, highly reproducible patterns exhibiting up to 25 bands of variable intensity in the range from 200–2000 bp were obtained with the primer (GTG)₅ (Fig. 5). The analysis of these fingerprints allowed us to distinguish all investigated species. At the intraspecific level, geographical isolates coming from distant regions (more than 500 km apart) could also be separated (i.e. the American from all European isolates of *M. esculenta*, or the American and the Canadian isolates of *M. angusticeps* from each other). At a narrower geographical scale (below 200–300 km), no intraspecific polymorphism could be observed. Both Israeli isolates of *M. conica*, and both German isolates of *Mitrophora* displayed similar band pattern and so did all European strains of *M. esculenta*. Under these conditions, characterization of the monosporal and heterokaryotic strains in the latter species was not possible.

DISCUSSION

Identification of organisms on the basis of DNA investigation requires the location of DNA targets giving the adequate degree of discrimination. In their investigation on morels Bunyard *et al.* (1994) showed that the 28S rRNA gene exhibits no length polymorphism in *Morchella* and *Verpa*. After RFLP of this DNA region the authors could separate two species groups in *Morchella*. Bruns *et al.* (1991) have shown that the ITS and IGS regions exhibit a high polymorphism within the

rDNA of basidiomycetes. In the ascomycete *Tuber*, the length polymorphism of the less variable ITS region was adequate for characterization of most species, and only separation of closely related taxa or intraspecific discrimination necessitated investigation of the IGS region and restriction analyses (Henrion *et al.*, 1994).

In the present work, the length polymorphism of the ITS region permitted discrimination between *Gyromitra*, *Disciotis* and *Mitrophora*, and the two morphological species groups in *Morchella* recognized by Boudier (1897): (i) the *adnatae* morels (base of the hymenium not free) to which *M. esculenta* and *M. crassipes* belong; (ii) the *distantes* species (base of hymenium free) to which *M. conica* and *M. angusticeps* belong. *Verpa* could be separated from the latter group after a double restriction with *EcoR* I and *Rsa* I, which did not allow further discrimination in the other groups. Thus, in morels, the length polymorphism of the ITS region appeared less resolutive than in *Tuber*. Nevertheless, this spacer of the rDNA exhibited a higher polymorphism than the 28S RNA gene of morels (Bunyard *et al.*, 1994).

The IGS PCR of morels gave reproducible multiple band patterns under standard reaction conditions. By varying several factors, the number of multiple bands could be reduced for all samples. This indicates either a differential specificity of the 5SA primer for possibly existing repeats of the 5S sequence in the IGS (Gniadkowski, Fiett & Borsuk, 1991) or that stringent reaction conditions can inhibit the heteroduplex

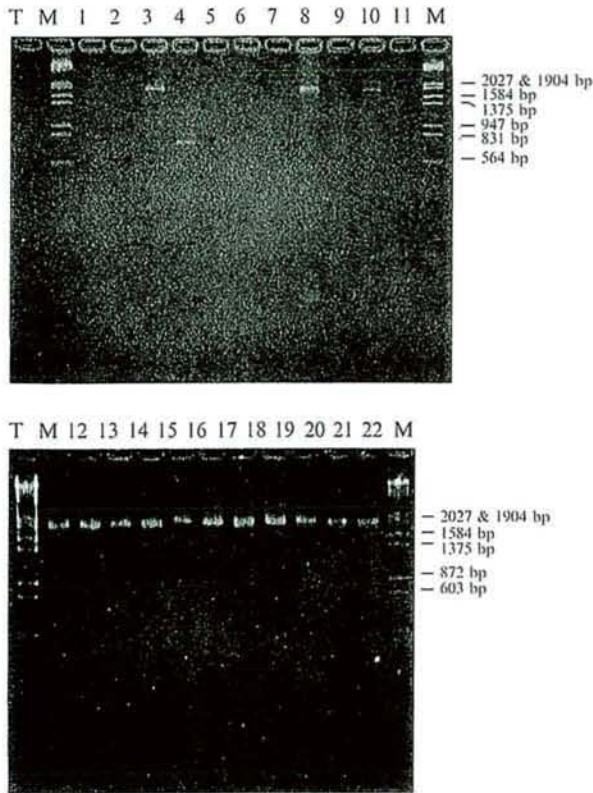


Fig. 3. Agarose electrophoresis gel of the rDNA spacer IGS of different Helvellaceae and Morchellaceae (empty lanes correspond to samples for which artefactual multiple bands were obtained). C, control; M, fragment size markers (λ digested by *EcoRI* and *Hind III* *Hae III*); 1, *Cyromitra esculenta*; 2, *Verpa conica*; 3 & 12, *Morchella esculenta* Mo24; 4, *Disciotis venosa*; 5, *Morchella conica*₁₆; 6, *M. conica*₁₈; 7 & 11, *Morchella angusticeps* AnUS; 8, *M. esculenta* MoUS; 9, *M. angusticeps* AnCan; 10, *Morchella crassipes*; 13–22, *M. esculenta* (13, A7; 14, B7; 15, A0; 16, B0; 17, A7B7; 18, A0A7; 19, B0A7; 20, A0B7; 21, B0B7; 22, A0B0).

formation during PCR (Jensen & Straus, 1993), both phenomena being presumably responsible for multiple band patterns in PCR products. Under stringent conditions, a unique amplification fragment was obtained for all strains of *M. esculenta*, and for *M. crassipes* and *Disciotis venosa*. In *M. esculenta*, the partial sequencing of this fragment (data not shown) confirmed its corresponding to the IGS region. For this reason, the results of the IGS PCR were only analysed for samples which produced a unique band. These fragmentary results confirmed the discrimination by the ITS PCR for the concerned strains. Additionally, *M. crassipes* and *M. esculenta* could be separated by restriction of their IGS fragment with *Hinf I*, indicating that the IGS region exhibits more polymorphism than the ITS. Nevertheless, this polymorphism did not allow separation of the different geographical isolates of *M. esculenta* even after restriction analysis.

Microsatellite-primed PCR has been demonstrated to be adapted for investigations at the intraspecific level. In ascomycetous yeasts, it allowed characterization of individuals (Welsh & McClelland, 1990; Growhurst *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1992; Schönian *et al.*, 1993). The lack of amplification with the microsatellite primer (GACA)₄ observed in the present work can be due to the fact that complementary sites to this

Table 4. Length polymorphism of the rDNA spacer IGS in one Helvellaceae and in some Morchellaceae

	Fragments size (bp)		
	751	1913	Multiple bands
<i>Cyromitra esculenta</i>			+
<i>Verpa conica</i>			+
<i>Mitrophora semilibera</i> 1			+
<i>Mitrophora semilibera</i> 2			+
<i>Disciotis venosa</i>	+		
<i>Morchella conica</i> ₁₆			+
<i>Morchella conica</i> ₁₈			+
<i>Morchella angusticeps</i> fungi perfecti USA			+
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785		+	
<i>Morchella angusticeps</i> PennState 198			+
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277		+	
<i>Morchella esculenta</i> Mo 24 ₂		+	
A7		+	
B7		+	
A0		+	
B0		+	
A7B7		+	
A0A7		+	
B0A7		+	
A0B7		+	
B0B7		+	
A0B0		+	

oligonucleotide are less frequent in fungi than in other eukaryotes (Meyer *et al.*, 1992). Thus, the distance between two annealing sites for this primer in more DNA could have been too great to allow successful PCR. The fingerprint PCR with the primer (GTG)₅ allowed an immediate characterization of all investigated species. Nevertheless, intraspecific discrimination could only be achieved at a large geographical scale (more than 200 km distance) and the investigated monosporal and heterokaryotic strains of *M. esculenta* could not be distinguished. Thus this highly sensitive PCR did not allow a similar discrimination level as in the examples mentioned above.

The discrimination potential of the different PCR methods used in this work allows a first evaluation of their adequacy to resolve questions on systematics and biology of morels. After designing more specific primers for the IGS region, supplementary investigations of the ITS and IGS regions with additional restriction analysis and sequencing should be adequate to improve the controversial phylogeny and systematics of morels for which from 3 to 50 species are recognized by different authors (Korf, 1973). Both rDNA spacers appear to be more convenient for such investigations in morels than the 28S rDNA by which more variation was observed between populations than among putative species (Bunyard *et al.*, 1994). The relatively low level of discrimination obtained with both the ITS (genus or species group) and the microsatellite-primed PCR indicates that the high morphological diversity of morels does not correspond to a particularly

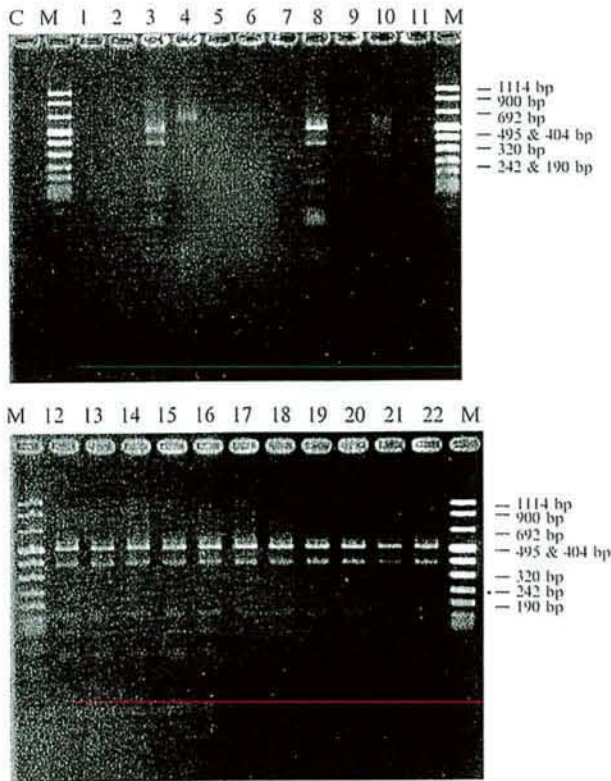


Fig. 4. Agarose electrophoresis gel of the restriction fragments of the rDNA spacer IGS of different Morchellaceae digested by the restriction enzymes *Hinf* I. C, control; M, fragment size markers (pUBM21 digested by *Hpa* II and pUBM21 digested by *Dra* I and *Hind* III). 1, *Gyromitra esculenta*; 2, *Verpa conica*; 3 & 12, *Morchella esculenta* Mo24; 4, *Disciotis venosa*; 5, *Morchella conica*₁₆; 6, *M. conica*₁₈; 7 & 11, *Morchella angusticeps* AnUS; 8, *M. esculenta* MoUS; 9, *M. angusticeps* AnCan; 10, *Morchella crassipes*; 13–22, *M. esculenta* (13, A7; 14, B7; 15, A0; 16, B0; 17, A7B7; 18, A0A7; 19, B0A7; 20, A0B7; 21, B0B7; 22, A0B0).

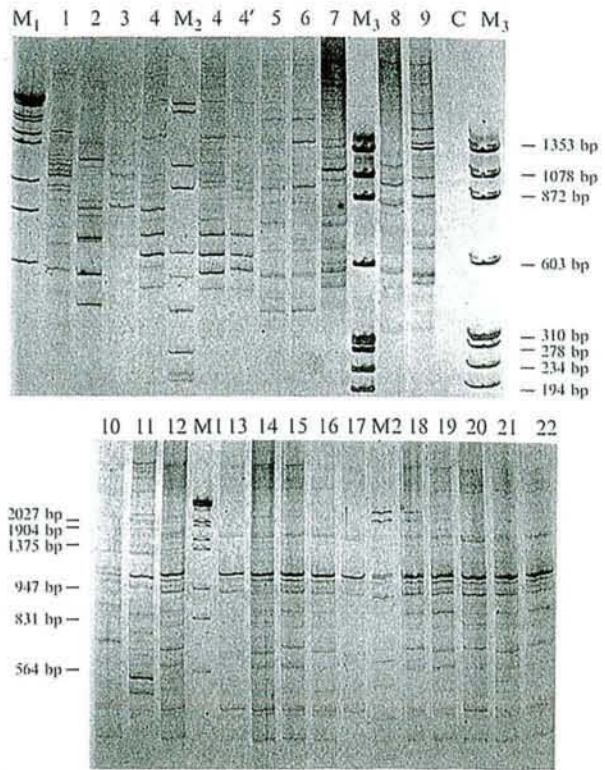


Fig. 5. Polyacrylamide electrophoresis gel of microsatellite-primed PCR of different Morchellaceae and Helvellaceae. M₁, fragment size marker (λ digested by *Eco*R I and *Hind* III); M₂, fragment size markers (pBr238 digested by *Bgl* I and pBr238 digested by *Hinf* I); M₃, fragment size markers (Φ X174 digested by *Hae* III); C, control; 1, *Gyromitra esculenta*; 2, *Disciotis venosa*; 3, *Verpa conica*; 4, *Mitrophora semilibera* 2; 4', *Mitrophora semilibera* 1; 5, *Morchella conica*₁₆; 6, *M. conica*₁₈; 7 & 11, *Morchella angusticeps* AnUS; 8, *M. esculenta* Mo24; 9, *M. angusticeps* AnCan; 10, *Morchella crassipes*; 12, *Morchella esculenta* Mo24; 13–22, *M. esculenta* (13, A7; 14, B7; 15, A0; 16, B0; 17, A7B7; 18, A0A7; 19, B0A7; 20, A0B7; 21, B0B7; 22, A0B0).

Table 5. Restriction fragment length polymorphism of the rDNA spacer IGS digested with *Hinf* I in strains of different *Morchellaceae*

	Fragments size (bp)								
	55	110	162	278	345	397	514	577	636
<i>Disciotis venosa</i>									+
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785	+	+	+			+	*		
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277				+	+		+	+	
<i>Morchella esculenta</i>									
Mo 24 ₂	+	+	+			+	*		
A7	+	+	+			+	*		
B7	+	+	+			+	*		
A0	+	+	+			+	*		
B0	+	+	+			+	*		
A7B7	+	+	+			+	*		
A0A7	+	+	+			+	*		
B0A7	+	+	+			+	*		
A0B7	+	+	+			+	*		
B0B7	+	+	+			+	*		
A0B0	+	+	+			+	*		

* Because of the high intensity or brightness of their electrophoretic band (see Fig. 4), the products marked with a star probably correspond to double fragments.

high DNA polymorphism and thus tends to reinforce the opinion of Korf (1972) that only a few 'good' species exist in morels. Preliminary cluster analyses of the microsatellite-

primed-PCR (data not shown) support the point of view of Smith-Weber (1988) that *M. conica* and *M. angusticeps* belong to a common taxon, as do *M. esculenta* and *M. crassipes*. These

results reinforce the contention of Berthet (1964) that the species concept itself is questionable in morels, as also suggested by the crossing experiments between mycelia of different morel 'species' by Bresinsky *et al.* (1972). Improvement of the species concept in morels requires mating experiments. Methods of ascospore production have been proposed (Molliard, 1905; Ower, 1982; Ower, Mills & Malchowsky, 1986) but they were never used for such investigations.

This controversy highlights the necessity of using two parallel ways in further investigations of heterokaryons in morels. A first will be the use of additional PCR primers and restriction enzymes in order to achieve the characterization of monosporal strains within one 'species', the other will be based on crossing experiments between strains belonging to 'species' which can be separated with the PCR analyses performed here.

This work was performed within the framework of the German-French co-operation project PROCOPE. F. Buscot is indebted to the program Eureka-Eurosilva for a research training grant allowing him to visit the INRA-Nancy (France) to learn the PCR methods. Best thanks also to Dr. C. Tebbe and to F. Schwieger for kindly providing research facilities at the FAL in Braunschweig (Germany) and to Dr Guy Costa (Microbiologie Forestière INRA-Nancy) for his helpful comments on the use of the microsatellite-primed PCR. Herbert Boyle kindly revised the language.

REFERENCES

- Bassam, B. J., Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P. M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gel. *Annals of Biochemistry* **196**, 80–83.
- Berthet, P. (1964). Essais biotaxonomique sur les discomycètes. *Thèse d'état*, Faculté des Sciences de Lyon.
- Boudier, E. (1897). Révision analytique des morilles de France. *Bulletin de la Société mycologique de France* **13**, 130–150.
- Bresinsky, A., Glaser, W. & Stangl, J. (1972). Untersuchungen zur Sippenstruktur der Morchellaceen. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft* **42**, 127–143.
- Bruns, T. D., White, T. J. & Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**, 525–564.
- Bunyard, B. A., Nicholson, M. S. & Royse, D. J. (1994). A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* **86**, 762–772.
- Buscot, F. (1992). Stratégies écologique et biologique des morilles. *Cryptogamie Mycologie* **13**, 171–179.
- Buscot, F. (1993). Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycological Research* **97**, 136–140.
- Costa, Y. & Martin, F. (1995). Specific genomic fingerprint of ectomycorrhizal fungi generated with intermicrosatellite PCR. *The New Phytologist*, submitted.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. & Taylor, J. W. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany* **69**, 180–190.
- Gniadkowski, M., Fiett, J. & Borsuk, P. (1991). Structure and evolution of the 5S rRNA genes and pseudogenes in the Genus *Aspergillus*. *Journal of Molecular Evolution* **33**, 175–178.
- Growhurst, R. N., Hawthorne, B. T., Rikkerink, E. H. A. & Templeton, M. D. (1991). Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Current Genetics* **20**, 391–396.
- Henrion, B., Chevalier, G. & Martin, F. (1994). Typing truffles 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. *The New Phytologist* **122**, 289–298.
- Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 3–12. New York, U.S.A.
- Jensen, M. A. & Straus, N. (1993). Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Methods and Application* **3**, 186–194.
- Korf, R. P. (1972). Synoptic key of the genera of the Pezizales. *Mycologia* **64**, 937–993.
- Korf, R. P. (1973). Discomycetes and Tuberales. In *The Fungi*, Vol. IV (ed. G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow, A. S. Sussmann), pp. 249–319. Academic Press: New York-London.
- Meyer, W., Lieckfeldt, E., Wöstemeyer, J. & Börner, T. (1992). DNA fingerprinting for differentiating aggressivity groups of the rape seed pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mycological Research* **96**, 651–657.
- Molliard, M. (1905). Production expérimentale de l'appareil ascospore de la morille. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* **140**, 1146–1148.
- Ower, R. (1982). Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* **74**, 142–144.
- Ower, R., Mills, G. L. & Malachowsky, J. A. (1986). Cultivation of *Morchella*. *US Patent*, nb 4, 594, 809.
- Panaccio, M. and Lew, A. (1991). PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acid Research* **19**, 1151.
- Petersen, P. M. (1985). The ecology of Danish soil inhabiting Pezizales with emphasis on edaphic conditions. *Opera Botanica* **77**, 5–38.
- Rayner, A. D. M. (1991). The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* **83**, 48–71.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuri, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Sambrook, J., Fritsch, F. E. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. In *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Schönian, G., Meusel, O., Tietz, H.-J., Meyer, W., Gräser, Y., Tausch, I., Presber, W. & Mitchell, T. G. (1993). Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with polymerase chain reaction. *Mycoses* **36**, 171–179.
- Smith-Weber, N. (1988). A morel hunter's companion. Two Peninsula Press: Lansing, Michigan, U.S.A.
- Volk, T. & Leonard, T. (1989). Experimental studies on morel. I. Heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia* **81**, 523–531.
- Weber, E. & Bresinsky, A. (1992). Polyploidy in discomycetes. *Persoonia*, **14**, 553–563.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**, 7213–7218.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 315–322. Academic Press: San Diego, U.S.A.

5.2 Polymorphisme de la région ITS de l'ADNr

Publication n°4

DNA polymorphism in morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in Morchella esculenta (yellow morel) and Morchella conica (black morel).

Wipf, D., J.C. Munch, B. Botton, & F. Buscot (1996)
Applied Environmental Microbiology **62**, 3541-3543

&

Publication n°5

DNA polymorphism in morels: Diversity of the Internal transcribed Spacer sector of rDNA.

Wipf, D., A. Fribourg, B. Botton et F. Buscot (soumis)
Applied Environmental Microbiology

A l'issue des publications n° 2 et 3, il s'est avéré que parmi les méthodes d'investigation moléculaires testées (isoenzymologie, PCR dirigée et PCR aléatoire), l'analyse du polymorphisme de l'espaceur interne transcrit de l'ADNr constitue la meilleure approche pour l'étude critique de la systématique des morilles. La région ITS a donc été retenue pour une étude PCR/RFLP avec digestion par *Eco RI/Rsa I*. L'étude a porté sur un ensemble de 96 souches représentant les espèces précédemment étudiées mais également des taxons contestés tels *Gyromitra infula*, *Morchella hortensis*, *M. spongiola* var. *dunensis*, *M. costata* et *M. elata*. En outre, au sein du genre *Morchella*, le spectre de l'origine géographique des souches a été élargi, au delà de l'Europe occidentale et de l'Amérique du Nord, à l'Amérique Centrale, l'Afrique du Nord ainsi qu'à l'Australie et la Nouvelle Zélande. Afin d'affiner les résultats, les analyses ont été répétées jusqu'à obtention de dix amplifiats et dix profils de restriction par souche. Soixante six souches représentant la totalité des espèces et origines géographiques étudiées ont été prises en compte dans la publication 5 (Publication 5, Tab. 1), les trente souches restantes et la longueur de leur région ITS sont répertoriées dans le tableau 10.

Afin d'affiner l'analyse, le séquençage de l'ITS a été entrepris sur des souches représentatives des principaux taxons étudiés. A cet effet, un travail préliminaire (Publication 4, Fig. 1) a porté sur le séquençage de cette région chez *M. esculenta* et *M. conica*, comme représentants respectifs des morilles jaunes et des morilles noires. A l'exception de quelques paires de bases à l'extrémité 5' chez *M. conica*, la totalité de l'espaceur a pu être séquencé sur les deux morilles. L'alignement des séquences a fait ressortir que la différence de

longueur de l'ITS des morilles noires et des morilles jaunes provient de plusieurs fragments supplémentaires d'ADN d'une longueur maximale de 66 pb qui sont dispersés dans les régions ITS1 et ITS2 de *M. esculenta*. En revanche, le gène 5,8S est quasiment intégralement conservé.

L'analyse PCR/RFLP a permis d'affiner les distinctions de genre et groupes d'espèce précédemment établies (Publication 3) et, au niveau spécifique, d'éclaircir le statut de taxons contestés. Ainsi, chez *Gyromitra*, la distinction entre *G. esculenta* et *G. infula* proposée par certaines classification apparaît non justifiée. Chez les morilles vraies, le polymorphisme de longueur de l'ITS confirme la valeur de la distinction entre morilles noires et morilles jaunes, mais il apparaît qu'au sein de ce dernier groupe spécifique, un ensemble regroupant *M. spongiola* var. *dunensis*, *M. hortensis* et *M. crassipes* doit être distingué du fait d'une longueur de l'ITS de 1225-1231 pb contre 1157-1159 pb pour l'ensemble *M. esculenta* et *M. vulgaris* (Publication 5, Fig. 1). Ces deux derniers taxons ne sont pas séparables à l'issue de l'analyse de restriction et présentent une homologie de séquence supérieure à 98%. La validité de leur distinction apparaît donc contestable. En revanche, les trois espèces du groupe de 1225-1231 pb sont nettement séparées par la restriction et l'analyse de séquence (Publication 5, Fig. 2 & 3). Il est à noter que les deux échantillons de *M. crassipes* étudiés ne sont pas classés dans le même sous groupe des morilles jaunes, cette ambiguïté sera analysée dans la conclusion générale. Les quatre taxons de morilles noires étudiés ne sont pas séparables à l'issue de l'analyse de restriction, mais le polymorphisme des séquences permet de distinguer *M. conica* de *M. elata* et *M. angusticeps*, lesquelles semblent appartenir à un taxon unique.

L'obtention de dix amplifiats s'est avérée plus délicate pour certain des taxons étudiés. Ainsi, le taux de succès de la PCR a varié entre 50% (*M. spongiola* var. *dunensis*) et 90% (*M. esculenta*). Sur les matériels à amplification plus difficile, le séquençage complet de l'ITS s'est révélé plus délicat (Publication 5, fig. 3). L'analyse phylogénétique des séquences par maximum de parsimonie et Neighbor-Joining indique une structure nettement polyphylétique du genre *Morchella* (Publication 5, Fig. 4 & 5). La localisation des genres *Verpa* et *Mitrophora* au sein du phylum *Morchella* à proximité du groupe des morilles noires, confirme l'indication donnée par des longueurs d'ITS proches. Ces derniers résultats indiquent la nécessité de reconsidérer la définition même du genre *Morchella* (voir conclusion générale).

DNA Polymorphism in Morels: Complete Sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (Yellow Morel) and *Morchella conica* (Black Morel)

DANIEL WIPF,^{1*} JEAN-CHARLES MUNCH,² BERNARD BOTTON,¹ AND FRANÇOIS BUSCOT²

Université Henri Poincaré, Laboratoire de Biologie Forestière, Unité de Physiologie Mycorhizienne, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France,¹ and Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, D-38116 Braunschweig, Germany²

Received 9 April 1996/Accepted 27 June 1996

The internal transcribed spacer (ITS) of the gene coding for rRNA was sequenced in both directions with the gene walking technique in a black morel (*Morchella conica*) and a yellow morel (*M. esculenta*) to elucidate the ITS length discrepancy between the two species groups (750-bp ITS in black morels and 1,150-bp ITS in yellow morels).

In members of the family Morchellaceae, isozymes (10, 16, 19, 25, 27) and the gene coding for the 28S rRNA (rDNA) (4, 5) sometimes exhibit higher intraspecific than interspecific variations, illustrating the difficulty of systematics and the species concept in the family (2, 3, 9, 15). Recently, Buscot et al. (6) showed that polymorphism of the internal transcribed spacer (ITS) of rDNA is more adequate to improve morel systematics. Both species groups recognized in all classifications, i.e., black (*sectio distantes*) (14, 21) and yellow (*sectio adnatae*) morels, exhibited respective ITS lengths of 740 to 750 and 1,150 to 1,220 bp (6). Furthermore, slight length variations and different restriction profiles allowed the identification of several species within each group (26). In the present work, the whole ITS region of a black morel (*Morchella conica*) and a yellow morel (*M. esculenta*) was sequenced to identify the origin of the ITS length difference between the two species groups.

The analyses were performed on monosporal isolates of *M. esculenta* and *M. conica*, which are deposited under the accession numbers DSM 10374 and DSM 10464 in the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). The strain cultivation, DNA extraction, and ITS PCR methods used were similar to those described by Buscot et al. (6); the ITS1 and ITS4 primers were used to amplify the ITS region plus a small portion each of the 3' end of the 17S rDNA and the 5' end of the 25S rDNA (24). The amplified DNAs were purified with microspin columns (Pharmacia) and sequenced in both directions by Genome Express (Grenoble, France). The sequencing reaction was performed by PCR amplification in a final volume of 20 ml using 100 ng of PCR products, 5 pmol of primers, and 9.5 ml of premixed Dye Terminators in accordance with the Applied Biosystems protocol. After heating to 94°C for 2 min, the reaction mixture was subjected to 25 cycles of 30s at 94°C, 30s at 55°C, and 4 min at 60°C (9600 thermal cycler; Perkin Elmer). Removal of any excess of Dye Terminators was performed with Quick Spin columns (Boehringer Mannheim). The samples were dried in a vacuum centrifuge and dissolved with 4 ml of deionized form-

amide-EDTA (5/1 ratio) at pH 8.0. The samples were loaded onto an Applied Biosystems 373A sequencer and run for 12 h on a 6% denaturing acrylamide gel. Sequence data were stored, assembled, and analyzed with the biosequence editor and analysis application SeqApp version 1.9 (12) on an Apple Macintosh II SI computer. Multiple alignment of sequences was performed with the Clustal V package (13) interfaced to SeqApp. Nucleotide sequence comparisons were also performed at the National Center for Biotechnology Information by using the Basic Local Alignment Search Tool network service (1) against the National Center for Biotechnology Information databases (Non-redundant PDB, Gbupdate, GenBank, EMBLupdate, and EMBL; 1 March 1996). The whole procedure (cultivation, DNA extraction, ITS amplification, and sequencing) was performed twice for both species.

All amplification products were unique fragments with respective lengths of 1,133 (*M. esculenta*) and 710 (*M. conica*) bases that were identical in all replicates. In both fungi, one sequence extremity was similar to the 3' end of the ITS4 primer over 16 bases (total length of the primer, 20 bases). For *M. esculenta*, the other sequence extremity was highly complementary (18 of 19 bases) to the ITS1 primer; the base inversion was obviously due to a sequencing error. In the *M. conica* sequence, the ITS1 primer was totally lacking, indicating sequencing interruption. However, sequence alignment with *M. esculenta* indicated that probably only five bases of the *M. conica* ITS were not sequenced at this end. Because of the length of the analyzed region, sequencing without intermediary primers was delicate and led to these minute imprecisions or interruptions at the ends of the sequences. However, these did not prevent a clear interpretation. Furthermore, Basic Local Alignment Search Tool comparison revealed high-scoring seg-

TABLE 1. Comparison of the positions, lengths, and homologies of three regions in the ITS of the rDNAs of *M. esculenta* and *M. conica*

DNA	Localization, length (bp) of ITS region		% Homology between <i>M. esculenta</i> and <i>M. conica</i>
	<i>M. esculenta</i>	<i>M. conica</i>	
ITS1 spacer	44–538, 494	16–212,197	42.13
5.8S gene	539–711, 173	213–385,173	97.7
ITS2 spacer	712–1080,369	386–657,272	35.29

* Corresponding author. Mailing address: Université H. Poincaré-Nancy I, Laboratoire de Biologie Forestière, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France. Phone: 33 83 91 25 63. Fax: 33 83 90 32 77. Electronic mail address: wipf@scbiol.u-nancy.fr.

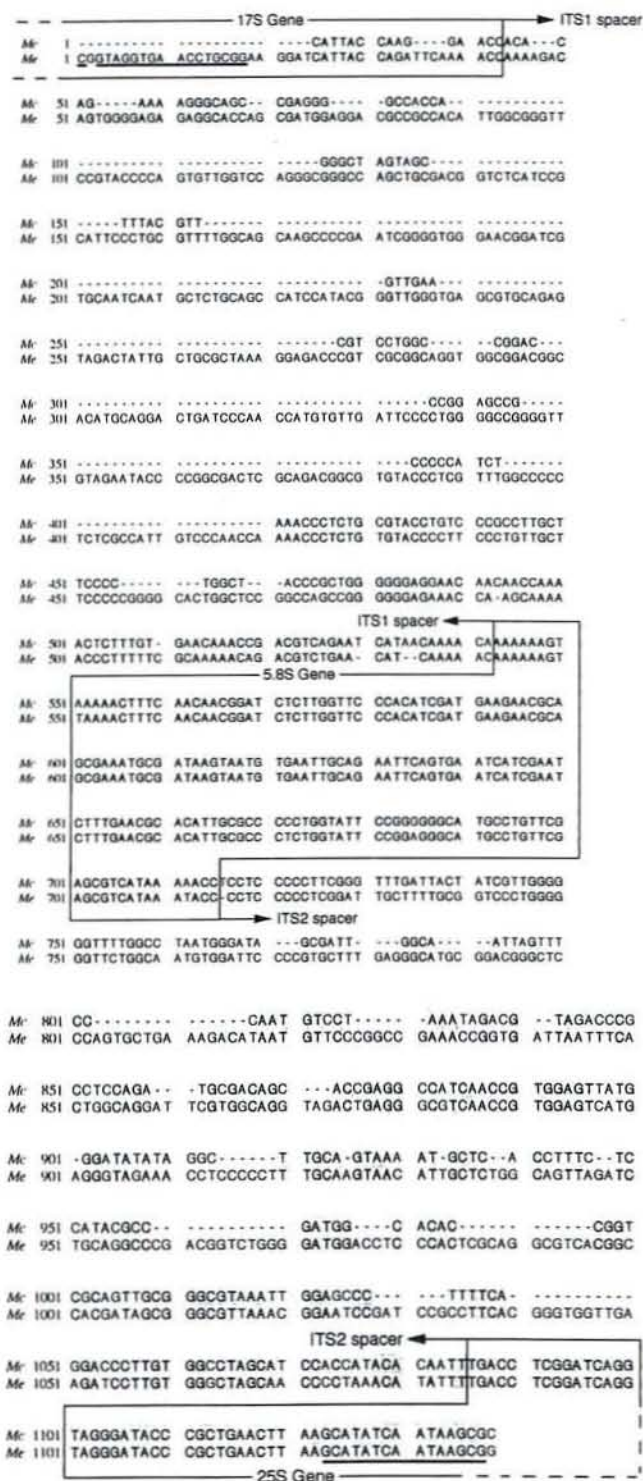


FIG. 1. Sequence alignment of the ITS of the rDNAs of *M. esculenta* (Me) and *M. conica* (Mc). Underlined bases indicate complementarity with the primers used to amplify the target region.

ment pairs (over 83%) exclusively between limited sectors of the sequences (bases 519 to 742 in *M. esculenta* and bases 163 to 404 in *M. conica*) and the 5.8S rDNAs of other ascomycetes. This confirmed that the amplified and sequenced regions both correspond to the morel ITS.

The high homologies with the 5.8S rDNAs of other ascomycetes allowed localization of the 5.8S gene and of the ITS1 and ITS2 spacers in the morels (Table 1 and Fig. 1). High sequence homology was observed between the 5.8S genes of both morels (Table 1). In contrast, the noncoding spacers ITS1 and ITS2 exhibited polymorphisms (Table 1 and Fig. 1). Good homologies characterized both the extremities of the spacers bordering the 5.8S gene and the 3' end of ITS2 (Fig. 1). Length discrepancy in ITS2 corresponded to several small additional fragments (up to 15 bases) between bases 793 and 1046 of the *M. esculenta* ITS (Fig. 1). Length discrepancy between the ITS1 spacers of both morels was concentrated principally between bases 89 and 420 of the *M. esculenta* ITS (Fig. 1). This region with insertions (40 to 68 bases) in *M. esculenta* showed only 25.1% homology between the two morels.

At the genus level, the degree of polymorphism in the noncoding ITS1 region varies among fungi (20). Less than 2% divergence and a constant length (200 bp) characterize the ITS1 regions of different *Sclerotium* species (7), whereas *Colletotrichum* species exhibit a homogeneous length (170 bp) with up to 16.5% base substitutions (22, 23). Previous reports have mentioned a constant length of the entire ITS at the genus level, with the polymorphism between species reduced to base substitutions of up to 16% (8, 17, 18). The length of the entire ITS diverges dramatically between *M. esculenta* and *M. conica*—a similar situation was described in the genus *Tuber*, another higher discomycete (11)—because of insertion-deletion substitutions in both the ITS1 and ITS2 spacers, interspersed with small conserved regions.

Nucleotide sequence accession numbers. The GenBank accession numbers for *M. esculenta* A7 and *M. conica* Col are U51851 and U51852, respectively.

This work was performed within the framework of the German-French cooperation project PROCOPE.

The strain of *M. conica* was kindly produced by Norbert Luschka. We are indebted to Francis Martin for discussion and constructive criticisms. Donal Patrick Lee Murphy kindly revised the language.

REFERENCES

- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Berthet, P. 1964. Essai biotaxonomique sur les discomycètes. Ph.D. thesis. Faculté des Sciences de l'Université de Lyon, Lyon, France.
- Bresinsky, A., W. Glaser, and J. Stangl. 1972. Untersuchungen zur Sippenstruktur der Morchellaceen. *Ber. Bayer. Bot. Ges.* 43:127-143.
- Bunyard, B. A., M. S. Nicholson, and D. J. Royle. 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86:762-772.
- Bunyard, B. A., M. S. Nicholson, and D. J. Royle. 1995. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa* and *Disciotis* [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal gene. *Exp. Mycol.* 19:223-233.
- Buscot, F., D. Wipf, C. Di Battista, J. C. Munch, B. Botton, and F. Martin. 1996. DNA polymorphism in morels. I. PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycol. Res.* 100:63-71.
- Carbone, I., and L. M. Kohn. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia* 85:415-427.
- Curran, J., F. Driver, J. W. O. Ballard, and R. J. Milner. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* 98:547-552.
- Gessner, R. V. 1995. Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. *Can. J. Bot.* 73(Suppl. 1):967-972.
- Gessner, R. V., M. A. Romano, and R. W. Schultz. 1987. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia* 79:683-687.
- Henrion, B., G. Chevalier, and F. Martin. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.* 98:37-43.
- Henrion, B., F. Le Tacon, and F. Martin. 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.* 122:289-298.
- Higgins, D. G., A. J. Bleasby, and R. Fuchs. 1992. Improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* 8:189-191.

14. **Jacquetant, E.** 1984. Les morilles. Plantanida, Lausanne, Switzerland.
15. **Korf, R. P.** 1973. Discomycetes and Tuberales, p. 249-319. In G. C. Ainsworth, F. K. Sparrow, and A. S. Sussman (ed.), The fungi, vol. 4. Academic Press, Inc., New York.
16. **Kulkarni, R., and G. D. Kamerath.** 1989. Isozyme analysis of *Morchella* species. Mushroom Sci. 12:451-457.
17. **Moukhamedov, R., X. Hu, R. N. Nazard, and J. Robb.** 1994. Use of polymerase chain reaction amplified ribosomal intragenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. Phytopathology 84:256-259.
18. **Neuvéglise, C., Y. Brygoo, B. Vercambre, and G. Riba.** 1994. Comparative analyses of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. Mycol. Res. 98:322-328.
19. **Royse, D. J., and B. May.** 1990. Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. Biochem. Syst. Ecol. 18:475-479.
20. **Seifert, K. A., B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield.** 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous ascomycetes and ascomycetous anamorphs. Can. J. Bot. 73(Suppl. 1):760-767.
21. **Smith Weber, N.** 1988. A morel hunters companion. Twopeninsula Press, Lansing, Mich.
22. **Sreenivasaprasad, S., A. E. Brown, and P. R. Mills.** 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotricum gloeosporioides*. Mycol. Res. 97:995-1000.
23. **Sreenivasaprasad, S., P. R. Mills, and A. E. Brown.** 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotricum* as *C. acutatum*. Mycol. Res. 98:186-188.
24. **White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Calif.
25. **Wipf, D., J.-P. Bedell, J. C. Munch, B. Botton, and F. Buscot.** Studies on polymorphism in morels. I. Isozyme electrophoretic analysis. Can. J. Microbiol., in press.
26. **Wipf, D., and F. Buscot.** Unpublished data.
27. **Yoon, C. S., R. V. Gessner, and M. A. Romano.** 1990. Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. Mycologia 82:227-235.

DNA polymorphism in morels: Diversity of the Internal Transcribed Spacer of rDNA.

Daniel WIPF^{1*}, Anne FRIBOURG¹, Jean Charles MUNCH², Bernard BOTTON¹ and François BUSCOT³

¹Université Henri Poincaré, Laboratoire de Biologie Forestière, Unité de Physiologie Mycorhizienne, BP 239, F-54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

²GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Institut für Bodenökologie, Neuherberg, D-85758 Oberschleißheim, Germany

³Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährung und Umwelt, Dornburgerstrasse 29, D-07743 Jena, Germany

Running title: Variations of ITS-region in morels

Correspondent Footnote:
D. Wipf
Université H. Poincaré - Nancy I
Laboratoire de Biologie Forestière
BP 239
F-54506 Vandoeuvre Les Nancy
Phone 33 83 91 25 63
Fax 33 83 90 32 77
E-Mail: wipf@sbiol.u-nancy.fr

ABSTRACT

The internal transcribed spacer (ITS) of rDNA was analyzed by PCR/RFLP and sequenced in both directions with the gene-walking technique in some *Morchellaceae*. In accordance with our previous study, ITS PCR/RFLP was adequate to characterize all studied genera within the *Morchellaceae* and even to separate species groups and single species within the more intensively investigated genus *Morchella*. Its length polymorphism observed within *Morchella* is higher than in basidiomycetes, but comparable to the one described in truffles or in several zygomycetes. The question arises however which level of separation, i.e. species or genus, this polymorphism reflects. The performed Neighbor Joining and Parsimony analyses of the sequences reinforce this question.

INTRODUCTION

Although many studies have been performed since the analytical revision of Boudier (2), the systematics of morels are still ambiguous (13). The basic difficulty is that the microscopic features of the hymenium are quite homogenous within the genus *Morchella* while the high variations in form and colour displayed by ascomata may as well correspond to specific characters as reflect different maturation states or ecological adaptations. Consequently, the number of distinguished species varies between 3 and 50 according to the authors (18).

In recent years, several authors have tested the adequacy of isozyme analyses and of PCR/RFLP of the 28S ribosomal DNA to improve the morel systematics (3; 12, 19, 24, 31, 33). Both appeared to be high performant methods for characterization of geographical isolates. However, higher intra- than interspecific variations were observed in certain cases, which led Gessner (13) to conclude that only a few morel species with considerable morphological variations exist. More recently, O'Donnell *et al.* (21) performed a phylogenetical study among ascomycetous truffles and true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. The central aim of this study was to assess the phylogeny of hypogeous taxa in higher ascomycetes and only five exemplars of *Morchellaceae* belonging to three distinct taxa were considered. Buscot *et al.* (5) investigated DNA polymorphism within the *Morchellaceae* with PCR methods of distinct sensitivities i.e. amplification and restriction analysis of both the internal transcribed (ITS) and the intergenic (IGS) spacers of ribosomal DNA and microsatellite primed-PCR. ITS-polymorphism appeared to be the most adequate approach to improve morel systematics. In particular the two species groups recognized in all classifications, i.e. black morels (27) also termed *sectio distantes* (17) and yellow morels also termed *sectio adnatae*, were clearly separated as they exhibited respective ITS lengths of 740-750 bp and 1130-1150 bp. A sequence analysis of one member of each species group, i.e. *Morchella conica* (black morel) and *Morchella esculenta* (yellow morel), was performed by the same authors (32). The ITS length difference appeared to be due to indels (insertion/deletions) of up to 66 bp within the ITS1 and ITS2 sectors of *M. esculenta*.

The present work constitutes an extension of the preliminary studies on ITS of morels to 66 strains of diverse geographical origins which represent 10 taxa in the *Morchellaceae* and 2 taxa in the *Helvellaceae*. The goal was to assess species assignment and phylogenetical relationships in the *Morchellaceae*.

MATERIALS AND METHODS

Fungal materials

The following taxa of the *Morchellaceae* were investigated in the study: *Disciotis venosa* (Pers.: Fr.) Boud.; *Mitrophora semilibera* (DC.: Fr.) Lév.; *Morchella angusticeps* (Peck) Boud.; *Morchella conica* Pers.; *Morchella costata* (Vent.) Boud.; *Morchella crassipes* (Krombh.) Boud.; *Morchella elata* (Fr.) Boud.; *Morchella esculenta* (L.: Fr.) Pers.; *Morchella hortensis* Boud.; *Morchella spongiola* var. *dunensis* (Boud.); *Morchella vulgaris* (Pers.) Boud.; *Verpa conica* (O. F. Müll.: Fr.) Swartz. Additionally two *Helvellaceae* were analysed, i.e. *Gyromitra esculenta* (Pers.: Fr.) Fr. and *Gyromitra infula* (Sch.: Fr.) Quéf. All characteristics of the analysed materials are summarized in Table 1. In most cases, cultures obtained from spore germinations (when possible, up to four monosporal isolates per ascoma) were used which are deposited at the "Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen" (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany). Seven non deposited strains and fourteen exciccata of ascomata are available by the senior author. Determination of the fungi was achieved by strains or ascomata legators.

Strain cultivations and DNA extraction

In the case of culture material, the strains were cultivated for 4-5 days in darkness at 25°C under vigorous agitation in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of malt extract (10 g · l⁻¹) glucose (5 g · l⁻¹) liquid medium. Mycelial pellets were harvested by filtration, washed twice with sterile distilled water and a few mg of each strain were used for DNA extraction. In the case of exciccata, few mg of the inner part of the ascoma stipe were used.

Total DNA was extracted from both kinds of materials according to the procedure of Henrion *et al.* (1994), resuspended in 50 μ l of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2.5 mM EDTA and stored at 4°C until use.

PCR amplification and RFLP analysis of the ITS region

The primers ITS1 and ITS4 used amplify the ITS region plus a small portion of 17S rDNA 3' end and of 25S rDNA 5' end, respectively corresponding to the primer regions (White *et al.*, 1990). The primers were synthesized and supplied by Bioprobe systems (Montreuil sous Bois, France). The PCR procedure used was described by Henrion *et al.* (15). Briefly, reactants for amplification were combined in 0.5 μ l polypropylene tubes to give a net volume of 100 μ l and concentrations of: 10 mM-Tris-HCl (pH8.8 at 25°C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X100, 0.1% gelatin, 20 pmol of each set of relevant unpurified primers, 200 μ M each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP and 0.05 to 0.5 ng DNA template (50 μ l of 20 to 1000-fold water dilution of the DNA extract). Following this, 2.5 units of Taq DNA polymerase (Appligene, ref 120.187A) were added to the tube content which was overlaid with two droplets of mineral oil (Sigma, ref. number M-5904).

The charged tubes were immediately placed into a "Crocodile III" (Appligene, Illkirch, France) thermocycler functioning under the tube temperature control mode. The thermal cycling parameters were an initial denaturation at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles (denaturation at 94°C for 1 min., annealing at 50°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 10 min. Controls without DNA were made to rule out the presence of contaminants in the reagents and reaction buffers. Agarose gels were stained with ethidium bromide, and photographed under UV light.

Two-thirds of the amplified DNA were digested for 1 h with 5 units of *Eco* RI + *Rsa* I (Biolabs) according to the manufacturers instructions. A screening performed in preliminary investigations (30), had shown that this combination of enzymes leads to a high performance ITS restriction analysis within *Morchellaceae*. The products of amplification and the restriction fragments were size-fractionated on 2% agarose gels (25).

Number of replicates

For each strain, cultivation, DNA extraction and PCR reaction were repeated until ten successful amplifications had been obtained. All amplicates were digested.

Data analysis

The gels were scanned and stored as TIFF-files and length values of amplification or restriction bands were determined using WinCam 2.0 (Cybertech, Berlin, Germany) on a PC work station.

DNA sequencing

In several strains representing the taxa differentiated by the PCR/RFLP analysis (Table 2), the amplified ITS region was sequenced in both directions by Genome Express (Grenoble, France). The sequencing reaction was performed by PCR amplification in a final volume of 20 μ l using 100 ng of PCR products, 5 pmol of primers and 9.5 μ l of premixed Dye Terminators in accordance with the Applied Biosystems protocol. After heating to 94°C for 2 min, the reaction mixture was subjected to 25 cycles of 30s at 94°C, 30s at 55°C, and 4 min at 60°C (9600 thermal cycler Perkin Elmer). Dye Terminators excess was removed with Quick Spin columns (Boehringer Mannheim). The samples were dried in a vacuum centrifuge and dissolved with 4 μ l deionized formamide EDTA (5/1) at pH 8.0. The samples were loaded onto an Applied Biosystems 373A sequencer and run for 12h on a 6% denaturing acrylamide gel.

Sequence Analysis

Sequence data were stored, assembled and analyzed with the biosequence editor and analysis application SeqApp version 1.9 (16) on an Apple Macintosh PowerBook 5300cs computer. Multiple alignment of sequences was performed with the Clustal V package (16) interfaced to SeqApp. Nucleotide sequence comparisons were also performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

network service against the NCBI databases (Non-redundant PDB + GBupdate + GenBank + EMBLupdate + EMBL; March 1, 1996).

Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) program 4d57 written by Swofford (28) was used to calculate distance matrices and to reconstruct phylogenies by parsimony and Neighbor-Joining methods. *Tuber melanosporum* (Y09789, Y09790) and *T. indicum* sequences (Y09791, Y09792) (9) were used as outgroup to root phylogenetic trees.

GenBank accession numbers

GenBank accession numbers for all sequences are listed in Table 2.

RESULTS

Length and restriction polymorphism of the Internal Transcribed Spacer

The PCR amplification of the ITS region was successful, as a unique amplification fragment was obtained in all investigated samples (Fig. 1). According to the taxa, the amplification success rate varied between 50% (*M. spongiola* var. *dunensis*) and 90 % (*M. esculenta*). For most strains, the size variations recorded within the 10 amplicates were lower than 6 bp. In *Verpa conica* 1 however, size variations of 20 bp were observed.

Based upon the length of the amplification fragments, five groups could be separated: (i), ITS length group 746-752 bp comprizes all isolates of *M. angusticeps*, *M. conica*, *M. costata*, *M. elata* and *Verpa conica*; (ii) ITS length group 839-845 bp comprizes all *Gyromitra* and *Mitrophora* strains; (iii) ITS length group 1003-1005 bp corresponds to both isolates of *Disciotis venosa*; (iv) ITS length group 1157-1159 bp includes all strains of *M. esculenta*, *M. crassipes* ATCC 13277 and *M. vulgaris*; (v) ITS length group 1225-1231 includes all strains of *M. spongiola* var. *dunensis* and *M. hortensis* plus both strains of *M. crassipes* Her.

Results of digestion with *Eco* RI/*Rsa* I are shown in Fig. 2 & Table 3. Reproducible band patterns were obtained in all digestion repeats of the different ITS amplicates. The size of PCR products estimated by adding the sizes of the restriction fragments was approximately similar to the size of the undigested PCR products in most cases (Table 3). The discrepancies observed in *D. venosa*, both *Gyromitra* species and in *M. spongiola* var. *dunensis* may

correspond to patterns with two restriction bands of the same size (doublets). In the case of *M. hortensis* 100 bp were missing from the sum of the restriction fragments, which could be explained by several fragments of small size not clearly detected by electrophoresis in 2% agarose gels. Within ITS length group 746-752 bp, the RFLP analysis allowed clear discrimination of *V. conica* from all black morels. Within ITS length group 839-845 bp, *Mitrophora semilibera* could be distinguished from both *Gyromitra* species. As in the case of the black morels, the RFLP allowed no separation between the yellow morels grouped in ITS length group 1157-1159 bp. In contrast, the three yellow morels of in ITS length group 1225-1231 bp were clearly separated by the restriction analysis.

ITS sequences analysis

In most analysed species, at least partial sequences were obtained and high scoring segment pairs (over 83%) with 5.8S rDNA of fungi in the ascomycetes after BLAST comparison confirmed that the sequences corresponded to morel ITS (Fig. 3). Furthermore, as the sequence extremities of *M. esculenta*, *M. crassipes* and *M. vulgaris* displayed high similarities with the ITS1 (17 from 19 bases) and the ITS4 primers (16 from 20), it could be assessed that the complete ITS of these three species had been sequenced. Sequencing difficulties occurred by species like *M. spongiola* var. *dunensis* for which lower amplification success rates had been recorded. In such cases, alignment with the complete sequences of the three yellow morels showed that the sequencing difficulties concerned the 5' end of the ITS1 region (Fig. 3). The complete sequencing of this ITS extremity failed because it was not possible to design intermediary primers. Excepted in the case of *M. hortensis*, for which sequencing was unsuccessful, these partial sequencing difficulties did not hinder the phylogenetic analyses.

As mentioned above, comparison with available ITS sequences of other ascomycetes allowed precise localization of the 5.8S gene from the ITS1 and ITS2 spacers in all *Morchellaceae* sequences (Fig. 3). Alignment of the sequences revealed high homologies between the 5.8S gene of all taxa and polymorphism within the noncoding spacers ITS1 and ITS2. Good homologies characterized the spacer extremities bordering the 5.8S gene and ITS2 3' end. ITS length discrepancies between the taxa appeared to correspond to indels up to

70 base pairs along the central part of the ITS1 and ITS4 spacers. ITS1 was the most variable region.

Phylogenetic Analyses

Parsimony and Neighbor-Joining analyses produced roughly similar trees in which three species groups could be distinguished, i.e. a yellow morels group, a group with *V. conica* and *M. semilibera* and a black morels group (Fig. 4 and 5). In particular, the tree based on the maximum parsimony analysis (Fig. 4) confirmed the species distinctions obtained after PCR/RFLP analysis within the yellow morels but revealed a genetic distance between *M. conica* and the identical taxa *M. angusticeps* and *M. elata* within the black morels. The tree based on the Neighbor-Joining analysis (Fig. 5) confirmed these separations and revealed that black and yellow morels have distinct phylogenetic origins within the *Morchellaceae*, indicating that the genus *Morchella* is clearly polyphyletic. Noteworthy is that in accordance with the RFLP analysis, the phylogenetic study clearly separated *V. conica*, which indicates that its common ITS length with black morels does not correspond to high sequence analogies.

DISCUSSION

Earlier findings showed that PCR/RFLP of the ITS region within ribosomal DNA represents a rapid and convenient method for characterization of fungal species (8, 10, 11, 20, 22). In morels, the polymorphism of this spacer revealed by the present study was higher than the one observed by Bunyard *et al.* (3, 4) in the 28S RNA gene. In accordance with our previous study (5), ITS PCR/RFLP was adequate to characterize all studied genera within the *Morchellaceae* and even to separate species groups and single species within the more intensively investigated genus *Morchella*. In addition to its already demonstrated ability (5) to separate black and yellow morels which correspond respectively to the *distantes* (base of hymenium free) and *adnatae* morels (base of the hymenium not free) distinguished by Boudier (2), the method allowed us to clearly separate *M. esculenta*/*M. vulgaris*, *M. spongiola* var. *dunensis*, *M. hortensis* and *M. crassipes* within the yellow morels. This latter finding refutes the consideration of Korf (18) and Dennis (6) that all yellow morels belong to a unique

species. The contradictory results between both isolates of the latter taxon correspond probably to a misidentification of the *M. crassipes* strain of the ATCC. Forms with hypertrophied stipes exist in *M. esculenta*. They have been termed *M. esculenta* var. *crassipes* by Jacquetant (17) and are easily confused with the real *M. crassipes*. After sequencing, an additional separation between *M. angusticeps*/*M. elata* and *M. conica* was possible in consideration of numerous basis substitutions along the ITS with common length. This result is in accordance with the classification proposed by Heim (14).

Taking into account that samples of diverse geographical origins were studied in the major taxa for most of which precise genetical distances could be assessed by sequence analysis of one representing strain, the validity of the separated taxa within *Morchella* can be considered as confirmed. For the same reasons, the separation between *M. esculenta* and *M. vulgaris* and between *M. elata* and *M. angusticeps* by certain authors can now be considered as probably erroneous.

The difficulty to amplify and sequence the ITS region of certain taxa is noteworthy. It may indicate either a differential specificity of the primer ITS1 for the 25S rRNA gene of the concerned species, or microheterogeneity of the multiple repeats of the gene copies in the nuclei as demonstrated for *Drosophila* (26) and Bacteria (7). To our knowledge however, the latter fact was not reported in fungi until now.

ITS length polymorphism observed within *Morchella* is higher than in basidiomycetes, but comparable to that described in truffles (15) or in several zygomycetes (23). The question arises however which level of separation, i.e. species or genus, this polymorphism reflects. The performed Neighbor Joining and Parsimony analyses of the sequences reinforce this question. Considering the genetic and phylogenetic distances revealed within the genus *Morchella* itself and between its different "taxa" and the two genera *Verpa* and *Mitrophora*, it appears justified to ask whether the black and yellow morels should not be considered as distinct genera, similarly as the false morels *Verpa* and *Mitrophora* were progressively excluded from the genus *Morchella* in the last century. According to morphological data summarized by Smith Weber (27) and to cytological studies of Berthet (1), yellow morels constitute the most evolved group within *Morchellaceae*. In consideration of this, our study indicates that morels would have increased their ITS length through multiple insertions during

evolution. However, as our study clearly shows a polyphyletic speciation within the *Morchellaceae* and probably within the genus *Morchella* itself, this provisory conclusion will possibly be nuanced in future, when ITS sequence analysis is achieved in supplementary taxa of this fungal group.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to David L. Swofford (Smithsonian Institute) for granting permission to publish the results of the neighbor-joining distance analysis obtained with PAUP 4d57. We are indebted to C. Turreta (Genome Express, Grenoble, France) for her tenacity by sequencing the problematic strains. Dr. G. Guedon gave useful advice for the phylogenetic analyses. Dr. E. McRae kindly revised the language.

REFERENCES

1. **Berthet, P.** 1964. Essai biotaxonomique sur les discomycètes. Thesis, University of Lyon, France.
2. **Boudier, E.** 1897. Révision analytique des Morilles de France. *B. Soc. Mycol.Fr.* **13**: 194-217.
3. **Bunyard, B.A., M.S. Nicholson and D.J. Royse.** 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* **86**: 762-772.
4. **Bunyard, B.A., M.S. Nicholson and D.J. Royse.** 1995. Phylogenetic resolution of *Morchella Verpa* and *Disciotis* [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal gene. *Exp. Mycol.* **19**: 223-233.
5. **Buscot, F., D. Wipf, C. Di Battista, J.C. Munch, B. Botton and F. Martin.** 1996. DNA polymorphism in morels I: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycol. Res.* **100**: 63-71.

6. **Dennis, R.W.G.** 1978. British ascomycetes (J. Cramer Ed.). Lehre.
7. **East, A., D. Allaway and M. Collins.** 1992. Analysis of DNA encoding 23S rRNA and 16S-23S rRNA intergenic spacer regions from *Plesiomonas shigelloides*. FEMS Microbiol. Lett., **95**: 57-62.
8. **Erland, S., B. Henrion, F. Martin, L.A. Glower and I.J. Alexander.** 1994. Identification of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tylospora fibrillosa* donk by RFLP analysis of the PCR amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. New Phytol. **126**: 525-532.
9. **Gandeboeuf, D.** 1997. Caractérisation et identification moléculaire de différentes espèces du genre *Tuber*. Thesis, University of Clermont-Ferrand, France.
10. **Gardes, M., T.L. White, J.A. Fortin, T.D. Bruns, and J.W. Taylor.** 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. Can. J. Bot. **69**: 180-190.
11. **Gardes, M., and T.D. Bruns.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol. **2**: 113-118.
12. **Gessner, R.V., M.A. Romano and R.W. Schultz.** 1987. Allelic variation and segregation in *Morchelladeliciosa* and *M. esculenta*. Mycologia **79**: 683-687.
13. **Gessner, R.V.** 1995. Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. Can. J. Bot., **73** (Suppl. 1): 967-972.
14. **Heim, R.** 1936. La culture des Morilles. *Revue de mycologie*, Suppl. **1**, 10-11 & Suppl. **2**, 19-25.
15. **Henrion, B., G. Chevalier and F. Martin.** 1994. Typing truffles species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. Mycol. Res. **98**: 37-43.

16. **Higgins, D.G., A.J. Bleasby and R. Fuchs.** 1992. Improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* **8**: 189-191.
17. **Jacquetant, E.** 1984. *Les Morilles*. Plantanida, Lausanne.
18. **Korf, R.P.** 1973. Discomycetes and Tuberales pp. 249-319. *In* G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman (ed.), *The Fungi* Vol.4, Academic Press, New York-London.
19. **Kulkarni, R. and G.D. Kamerath.** 1989. Isozyme analysis of *Morchella* species. *Mushroom Sc.* **12**: 451-457.
20. **Lee, S.B. and J.W. Taylor.** 1992. Phylogeny of five fungus like Protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 636-653.
21. **O'Donnell, K., E. Cigelnik, S.N. Weber and J.M. Trappe.** 1997. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia* **89**: 48-65.
22. **Persson, Y., S. Erland and H.B. Jansson.** 1996. Identification of nematode-trapping fungi using RFLP analysis of the PCR-amplified ITS region of ribosomal DNA. *Mycol. Res.* **100**: 531-534.
23. **Rohel, E., Coutaudier, Y., Papierok, B., Cavelier, N. and Dedryver, C.A.** 1997. Ribosomal internal transcribed spacer size variation correlated with RAPD-PCR pattern polymorphisms in the entomopathogenic fungus *Erynia neoaphidis* and some closely related species. *Mycol. Res.* **101**: 573-579.
24. **Royse, D.J. and B. May.** 1990. Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. *Biochem. System. Ecol.* **18**: 475-479.

25. **Sambrook, J., Fritsch, F.E. & Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. In *A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York, USA.
26. **Schlotterer, C., M. Hauser, A. Von Haeseler and D. Tautz,** 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS region in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **11**: 513-522.
27. **Smith-Weber, N.** 1988. A morel hunters companion. Twopeninsula Press, Lansing, Michigan.
28. **Swofford D.L.** 1997. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 4d57. Test program
29. **White, T.J.; T. Bruns, S. Lee and J. Taylor.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego.
30. **Wipf, D.** Unpublished results.
31. **Wipf, D., J.P. Bedell, J.C. Munch, B. Botton and F. Buscot.** 1996a. Polymorphism in Morels: Isozyme Electrophoretic Analysis. *Can. J. Microbiol.* **42**: 819-827.
32. **Wipf, D., J.C. Munch, B. Botton, and F. Buscot.** 1996b. DNA polymorphism in morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3541-3543.
33. **Yoon, C.S., R.V. Gessner and M.A. Romano.** 1990. **Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex.** *Mycologia* **82**: 227-235.

Legends of the Figures

Fig. 1: Agarose electrophoresis gel of the rDNA spacer ITS of different *Helvellaceae* and *Morchellaceae* isolates. M, fragment size markers Φ X174 digested by *Hae* III; 1, *M. esculenta* A7; 2, *M. spongiola* var. *dunensis* Du. 1, *M. elata* SH2; 4, *M. hortensis*; 5, *M. elata* SH3; 6, *M. conica* Co1; 7, *Gyromitra esculenta* Her 5; 8, *Mitrophora semilibera* PH1; 9, *Disciotis venosa* Her 1; 10, *Mitrophora semilibera* m952(1); 11, *Gyromitra infula* m954(3); 12, *Verpa conica* 3; 13, *M. esculenta* A0; 14, *M. crassipes* Her II.

Fig. 2: Agarose electrophoresis gel of the restriction fragments of the rDNA spacer ITS of different *Helvellaceae* and *Morchellaceae* isolates. M, fragment size markers Φ X174 digested by *Hae* III; 1, *M. esculenta* A7; 2, *M. hortensis*; 3, *M. elata* SH3; 4, *M. conica* Co1; 5, *Gyromitra esculenta* Her 5; 6, *Disciotis venosa* Her 1; 7, *Mitrophora semilibera* m952(1); 8, *Gyromitra infula* m954(3); 9, *Verpa conica* 3; 10, *M. crassipes* Her II; 11, *Mitrophora semilibera* PH1; 12, *M. esculenta* A0; 13, *M. spongiola* var. *dunensis* Du1; 14, *M. elata* SH2.

Fig. 3: Aligned sequences of the ITS region of *Morchellaceae* isolates. In the aligned sequences, a dash indicates a missing base, a gray zone indicates more than 60% homology between all the sequences.

Fig. 4: Tree based on the Maximum Parsimony analysis of the nucleotide sequences of the ITS region. The complete alignment was based on 1280 sites, 388 were phylogenetically informative. The bootstrap data were acquired by sampling sites 1000 times. Bootstrap values are indicated at the nodes of the dendrogram.

Fig. 5: Neighbor-Joining distance-based phylogenetic analysis of the ITS data. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distance.

Fig. 1

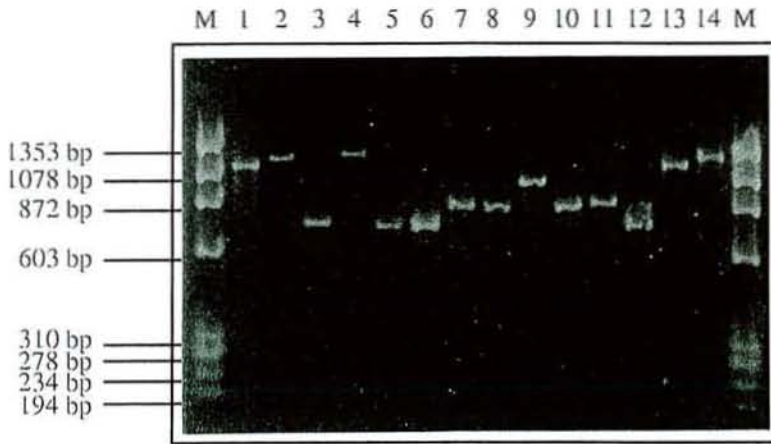


Fig. 2

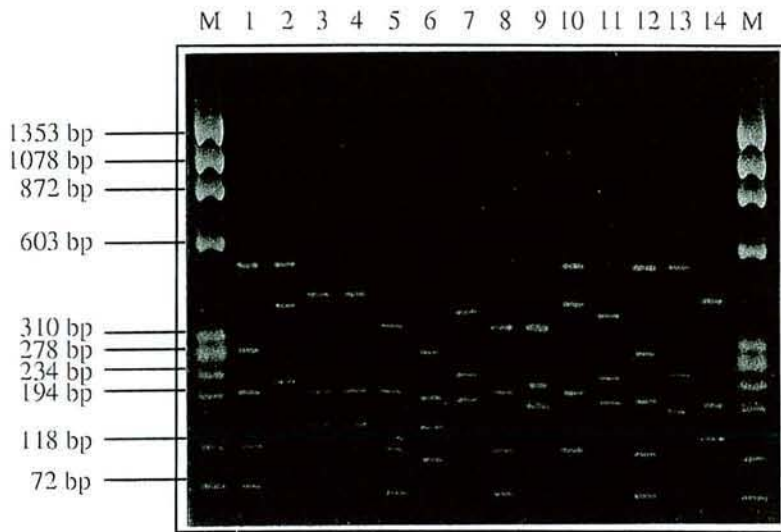


Fig. 3

	5	15	25	35	45
<i>M. esculenta</i>	-----C	GGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	AGATTCAAAA
<i>M. crassipes</i>	AGGAAAATTC	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	AGATTCAAAA
<i>M. vulgaris</i>	-----C	GGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	AGATTCAAAA
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	-----TTC	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTAA--	-AAT-----
<i>M. conica</i>	-----	-----	-----	---CATTACC	AAG----GAA
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-AG-----
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	-AG-----
<i>Mitrophora</i>	GGG-----	---GGTTAA	-----	-----	-----

	55	65	75	85	95
<i>M. esculenta</i>	C AAAAGACA	GTGG-----	GGAGAGAGGC	ACCAGCGATG	GAGG-ACGCC
<i>M. crassipes</i>	C AAAAGACA	GTGGCGGTCG	AGAGAGAGTC	AGCTACGATG	GGGGCGCGCC
<i>M. vulgaris</i>	C AAAAGACA	GTGG-----	GGAGA--CGC	ACCAGCGATG	GAGG-ACGCC
<i>M. dunensis</i>	--AAAAGA--	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. conica</i>	CCACA--CA	G-----	--AAAAGGGC	AGC--CGAGG	G-----GCC
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	--AAAAG--	-----	-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	-----	-----	-----	-----	-----

	105	115	125	135	145
<i>M. esculenta</i>	GCCA-----	-----CAT	-----TGGCG	GGTTCCGT-A	CCC-CAG--I
<i>M. crassipes</i>	GGCAACCAGA	CCGCTGGCAC	ACTGGTGGCG	GGTACTGTCA	CCCGCACTTI
<i>M. vulgaris</i>	GCCA-----	-----CAT	-----TGGCG	GGTTCCGT-A	CCC-CAG--I
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	-----AAA	TTATTAGC--	-----	-----	-----CT
<i>M. conica</i>	ACCA-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----GG	-----AGGCA	AAG--GGG-C	CGA-CAG--C
<i>M. elata</i>	-----	-----GG	-----AGGCA	AAG--GGG-C	CTA-CAG--C
<i>Mitrophora</i>	-----	-----	-----	-----	-----

	155	165	175	185	195
<i>M. esculenta</i>	GTTG----GT	--CC--AGG	GCGGG---C	CAGCTGCG-A	CGGTCTCATC
<i>M. crassipes</i>	GTTGCAACGT	--CC--AGG	GCGAGAGCCT	TAGCCGGGTG	TGGCCCCATC
<i>M. vulgaris</i>	GTTG----GT	--CC--AGG	GCGGG---C	CAGCTGCG-A	CGGTCTCATC
<i>M. dunensis</i>	-----	ACCC--AA-	-----	CAG--GCG-A	C-----
<i>Verpa</i>	GTCGCTACGT	GGCC--GCA	ATAGAA--CC	TAG-----	-----
<i>M. conica</i>	-----	-----	--GGG---C	TAGTAGC--	-----
<i>M. angusticeps</i>	ATTA----GT	AGCTTTTACG	-----	---T-TGTT	GAACGTCCTC
<i>M. elata</i>	GCTA----GT	AGCTTATACG	-----	---T-TGTT	GAACGTCCTC
<i>Mitrophora</i>	-----ACGT	A-----	-----	-----	-----

	205	215	225	235	245
<i>M. esculenta</i>	CGC-----	---ATTCC-	-----C	TGCGTTTT--	-----
<i>M. crassipes</i>	CGTTAAGCTA	GACAATTCCA	TGCTGCCTGC	TGCGCTCCCT	CCCCACGCC
<i>M. vulgaris</i>	CGC-----	---ATTTC-	-----C	TGCGTTTT--	-----
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	-----A	GACG-----	-----	-----	-----TGCTI
<i>M. conica</i>	-----	-----T-	-----T	TACGTT--	-----
<i>M. angusticeps</i>	-----	-GCTG-	-----	--GA--	-----C
<i>M. elata</i>	-----	-CCTG-	-----	--GA--	-----C
<i>Mitrophora</i>	-----	-----CA	CAC-----	-----CC	CCCCTCGC--

Fig. 3

	255	265	275	285	295
<i>M. esculenta</i>	--GGCAGCAA	-GCCCCG-AA	TCGGGG-TGG	GAAC-GGATC	GTGCAATCA
<i>M. crassipes</i>	TGGGCAGCAG	-CTCCCGCAA	TCGGGGGTGG	AAGCCGGATC	AAGGAATCA
<i>M. vulgaris</i>	--GGCAGCAA	-GCCCCG-AA	TCGGGG-TGG	GAAC-GGATC	GTGCAATCA
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	TGGGC-----	-----	CTAGGAGTGA	GGG-----	----AA--AA
<i>M. conica</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. angusticeps</i>	CCGG-AGC--	CGCCCC-AT	CTAAAC-CCT	CTGC-GTACC	TGTCCCTTCT
<i>M. elata</i>	CCGG-AGC--	CGCCCC-AT	CTAAAC-CCT	CTGC-GTACC	TGTCCCTTCT
<i>Mitrophora</i>	---GCAGCA-	-----CA-	-----	-----	-----
	305	315	325	335	345
<i>M. esculenta</i>	TGCT-CTGCA	GCCATCCATA	CGG-GTTGGG	TGAGCGTGCA	GAGTAGACTA
<i>M. crassipes</i>	TGCT-CTGCA	TACATTCATT	CAA--TTGAA	TGTG-GTGCA	GAGTAGGTTA
<i>M. vulgaris</i>	TGCT-CTGCA	GCCATCCATA	CGG-GTTGGG	TGAGCGTGCA	GAGTAGACTA
<i>M. dunensis</i>	---TTC---	GCCACCC--	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	T-----	---TCCA--	-----	-----	-----ATTA
<i>M. conica</i>	-----	-----	-GTTGAA-	-----	-----
<i>M. angusticeps</i>	TGCTTCCCC	GACATCTCGT	CG-----GGG	GGAGGGAACA	ACCAAACCTC
<i>M. elata</i>	TGCTTCCCC	GGCATCTCGT	CG-----GGG	GGAGGTAACA	ACCAAACCTC
<i>Mitrophora</i>	-----	--CATC---	-----	-----	-----
	355	365	375	385	395
<i>M. esculenta</i>	TTGCTGCGCT	AAAGGAGACC	CGTCGCGGCA	GGTGGCGGAC	GGCACATG--
<i>M. crassipes</i>	TTTCTGC-TG	AAGGGGGATC	C--CCCGGCA	GA-GGTGGAC	GGCACATG--
<i>M. vulgaris</i>	TTGCTGCGCT	AAAGGAGACC	CGTCGCGGCA	GGTGGCGGAC	GGCACATG--
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	---GCGG--	-----	-----G-
<i>Verpa</i>	T-----GTT	---GGAGATT	T-----	-----	-----ATGCT
<i>M. conica</i>	-----	-----	CGTCCTGGC-	-----CGGAC	-----
<i>M. angusticeps</i>	TTTGTGAATC	AAACAG---C	CGTC-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	TCTGTGAATC	AAACAG---C	CGTC-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	-----	-----	-----	AGTGGCCGA-	-----ACC
	405	415	425	435	445
<i>M. esculenta</i>	CAGG-----	---ACTGATC	CC--AACCAT	GT-GTTGATT	CCCC-TGGGG
<i>M. crassipes</i>	CAGGCTCCGA	ACGACGGAAG	CC--AACCAT	GTCGCTGAGT	CCCC-TGGGG
<i>M. vulgaris</i>	CAGG-----	---ACTGATC	CC--AACCAT	GT-GTTGATT	CCCC-TGGGG
<i>M. dunensis</i>	CAGG-----	---AC-----	---ACCA-	-----	CTCT-TA---
<i>Verpa</i>	CA---TCCGA	CCGCTTGATA	CCACG-----	-----GATT	---GTGGA-
<i>M. conica</i>	-----	-----	-----	-----	---C-CGGAC
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	CAGGC-----	-----	-----	-----	-----
	455	465	475	485	495
<i>M. esculenta</i>	CC-GGGG-TT	GTAGAATACC	CCGGCGACT-	--CGCAGACG	GCGTGTACCC
<i>M. crassipes</i>	CTAGGGG-CG	GTAAAAGCCC	CTAGCCACTC	CCC GCCGACG	GCGTTGACCC
<i>M. vulgaris</i>	CC-GGGG-TT	GTAGAATACC	CCGGCGACT-	--CGCAGACG	GCGTGTACCC
<i>M. dunensis</i>	-----GGTTT	GTCAA-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	-----TGT	GTAG-----	-----TC	CAAACGAACG	AC-----
<i>M. conica</i>	CC-G-----	-----	-----	-----	-----CCC
<i>M. angusticeps</i>	----AGAAAT	ATAAAACAAA	C-AAAAAGT-	--TAAAACT-	-TTCA-AC--
<i>M. elata</i>	----AGAAAT	ATAAAACAAA	C-AAAA-GT-	--TAAAACTT	TC---AAC--
<i>Mitrophora</i>	-----	---AAAGCA--	CCGGC-----	-----	-----CCC

Fig. 3

	505	515	525	535	545
<i>M. esculenta</i>	--TCG--TT	TGGCCCC--C	TCTCGCCATT	GTCCCAACCA	AAACCCCTCTG
<i>M. crassipes</i>	CATCG--TTC	TGGCACCC--	TCTCGCCACT	GTCCCAACCA	AAACCCCTCTG
<i>M. vulgaris</i>	--TCG--TT	TGGCCCC--C	TCTCGCCATT	GTCCCAACCA	AAACCCCTCTG
<i>M. dunensis</i>	-----	----CC--C	CCTCGCAACT	GTCCCAACCA	AAACCCCTCTG
<i>Verpa</i>	-ACCGGC---	-----	---GCAATT	ACTC-----	AAACCCCTCTG
<i>M. conica</i>	--CCA--TC-	T-----	-----	-----	AAACCCCTCTG
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	CATCGGCT--	--GCCCCGG	TCCCAA----	-----AACAA	AAACCCCTCTG
	555	565	575	585	595
<i>M. esculenta</i>	TGTACCCCTT	CCCTGTTGCT	TCCCCCGGGG	CACTGGCTCC	GGCCAGCCGG
<i>M. crassipes</i>	TGTACCC--TT	CCCTGTTGCT	TCCCCCGGGC	AACTGGCTCC	GGCCAGCCGG
<i>M. vulgaris</i>	TGTACCCCTT	CCCTGTTGCT	TCCCCCGGGG	CACTGGCTCC	GGCCAGCCGG
<i>M. dunensis</i>	TGTACCCCTT	CCCTGTTGCT	TCCCCCGGGG	AACTGGCTCC	GGCCAGCCGG
<i>Verpa</i>	TGTACCTTAT-	CCATGTTGCT	TCCCC---GC	TACC--CTTT	GGT--GC--G
<i>M. conica</i>	CGTACCTGTC	CCGCCTTGCT	TCCCC-----	---TGGCT--	-ACCCGCTGG
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	CGTACCTTCC	CCTCCTTGCT	TCCCCCGGCA	CAC-----	-----GTCGG
	605	615	625	635	645
<i>M. esculenta</i>	GGGGAGAAAC	CA-AGCAAAA	ACCCCTTTTC	GCAAAAACAG	ACGTC TGAA-
<i>M. crassipes</i>	GGGGAGAAAC	CA-AGCAAAA	ACCCCTTTT-C	GCAAAA-CAG	ACGTC TGAA-
<i>M. vulgaris</i>	GGGGAGAAAC	CA-AGCAAAA	ACCCCTTTTC	GCAAAAACAG	ACGTC TGAA-
<i>M. dunensis</i>	GGGGAGAAAC	CAA-GCAAAA	ACCCCTTTTT	CGAAAACAG	ACGTC CGAAI
<i>Verpa</i>	GGGGAGGTCC	CCAATCAA-	--CCCTTCAA	GCAAAAGC--	-GTCAGAAC
<i>M. conica</i>	GGGGAGGAAC	AACAACCAAA	ACTCTTTGT-	GAACAAACCG	ACGTCAGAAI
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Mitrophora</i>	GGGGAGGAAC	ACAACCCAAA	ACTCTTTG-C	GTGTAA-CCG	CCGTCAGAAI
	655	665	675	685	695
<i>M. esculenta</i>	CATCA-AAAA	CAAAA-----	--AA-GTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>M. crassipes</i>	CGCAA-AAAA	CAAAAACAAA	AAAA-GTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>M. vulgaris</i>	CATCA-AAAA	CAAAA-----	--AA-GTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>M. dunensis</i>	TTAAAAACAA	AACAA-----	--AAAGTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>Verpa</i>	----ACAAAA	AAAACAAAA	C---AGTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>M. conica</i>	CATAACAAA	CAAAA-----	--AAAGTAAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
<i>M. angusticeps</i>	-----	-----	-----	-----	AACGGATCTC
<i>M. elata</i>	-----	-----	-----	-----	AACGGATCTC
<i>Mitrophora</i>	TACAG-----	-ATACAAA	GAAAAGTTAA	AACTTTCAAC	AACGGATCTC
	705	715	725	735	745
<i>M. esculenta</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. crassipes</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. vulgaris</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. dunensis</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>Verpa</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. conica</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. angusticeps</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAATGCGA	TAAGTAATGI
<i>M. elata</i>	TTGG--TTCC	CACATCGATG	AAGAACGCAG	CGAAA-GCGA	TAAGTAATGI
<i>Mitrophora</i>	TTGGTTAT--	-----ATG	GAGTCCCC--	CAAGGGGGGA	C---CCTTGI

ITS1 ← 5.8S →

Fig. 3

	755	765	775	785	795
<i>M. esculenta</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. crassipes</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. vulgaris</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. dunensis</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>Verpa</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. conica</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. angusticeps</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>M. elata</i>	GAATTGCAGA	ATTCAGTGAA	TCATCGAATC	TTTGAACGCA	CATTGCGCCC
<i>Mitrophora</i>	GGATT--AGC	ACCCACC---	TCA-CAAA-C	TTTGA	-----CC

	805	815	825	835	845
<i>M. esculenta</i>	TCTGGTATTC	-CGGAGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	ATACC-CCTC
<i>M. crassipes</i>	TCTGGTATTC	-CGGAGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	ATACC-GCTC
<i>M. vulgaris</i>	TCTGGTATTC	-CGGAGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	ATACC-CCTC
<i>M. dunensis</i>	TCTGGTATTC	-CGGAGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	ATACCGGCTC
<i>Verpa</i>	TCTGGTATTC	-CGGGGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	ACA---ACTC
<i>M. conica</i>	CCTGGTATTC	-CGGGGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	AAACCTCCTC
<i>M. angusticeps</i>	CCTGGTATTC	-CGGGGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	AAACCTCCTC
<i>M. elata</i>	CCTGGTATTC	-CGGGGGGCA	TGCCGTGTCG	AGCGTCATAA	AAACCTCCTC
<i>Mitrophora</i>	TCGGAT---C	AGGTAGGG-A	TACCCGCT-G	AAC-TTAAGC	ATATC -----

	855	865	875	885	895
<i>M. esculenta</i>	CCCCTCGGAT	TGCTTTTGCG	GTCCCTGGGG	GGTTCGGCA	ATGTGGAT-T
<i>M. crassipes</i>	CCCCTCGGAT	TGCTT--GCG	GTCCCTGGGG	GGTTCGGCA	ATGTGGAT-T
<i>M. vulgaris</i>	CCCCTCGGAT	TGCTTTTGCG	GTCCCTGGGG	GGTTCGGCA	ATGTGGAT-T
<i>M. dunensis</i>	CCCCTCGGAT	TGAT--TGCG	ATCCCTGGGG	GGTTCGGCA	ATGTGGTC-T
<i>Verpa</i>	TCCCCAA--	-GCCTTTGTG	GT-GAAAGGG	GGTCGTGGCC	G-GTAG----
<i>M. conica</i>	CCCCTTCGGG	TTTGATTA CT	ATCGTTGGGG	GGTTTTGGCC	TAATGGGA-T
<i>M. angusticeps</i>	CCCCTTCGGG	TTTTGT TACT	ATCGTTGGGG	GGTTTTGGCC	TAATGGGA-T
<i>M. elata</i>	CCCCTTCGGG	TTTTGT TACT	ATCGTTGGGG	GGTTTTGGCC	TAATGGGA-T
<i>Mitrophora</i>	-----AA	TAA----GCG	G-----AGGA	AGACCTGGT-	--GTGCCAAC

	905	915	925	935	945
<i>M. esculenta</i>	CCCC-GTGCT	TTGAGGGCAT	GCGGACGGGC	TCCAGTGCT	GAAAGACATA
<i>M. crassipes</i>	CCCC-GTGCT	TTGAGGGCAT	GCGAACGGGC	TCCAGTGCT	GAAAGACATA
<i>M. vulgaris</i>	CCCC-GTGCT	TTGAGGGCAT	GCGGACGGGC	TCCAGTGCT	GAAAGACATA
<i>M. dunensis</i>	CCCCCGTGCT	TTGAGGGCAT	GCGAACGGGC	TCCAGTGCT	GAAAGACATA
<i>Verpa</i>	----CGT---	TTGACTCCAC	AAGGCTTTTC	GCTCGGTTTC-	-AAA-----
<i>M. conica</i>	A----GCGAT	T----GGCA-	----ATTAGT	TTCC-----	-----CA
<i>M. angusticeps</i>	AGCG---ATT	GGCA-----	-----	-----ATT	CGT-TTCCCA
<i>M. elata</i>	AGCG---ATT	GGCA-----	-----	-----ATT	CGT-TTCCCA
<i>Mitrophora</i>	GGCGTGTG--	---AAGAAAG	GTGAGCA---	---TATTACT	GCAAATCCA

	955	965	975	985	995
<i>M. esculenta</i>	ATGTTCCCGG	CCGAAACCGG	TGATTAATTT	CAC TGGCAGG	ATTCGTGGCA
<i>M. crassipes</i>	ATGTTCCCGG	CCGAAACCGG	TGATTAATTT	CATCGGCAGG	ATTCGTGGCA
<i>M. vulgaris</i>	ATGTTCCCGG	CCGAAACCGG	TGATTAATTT	CAC TGGCAGG	ATTCGTGGCA
<i>M. dunensis</i>	ACGTTCCCGG	CCGAAACCGG	TGGTAAATTT	CACCGGCAGG	ATTCGTGGCA
<i>Verpa</i>	---TCCTTGG	TCCGTA--GG	CT-TGGATGT	GGTC TGCAGC	GTA-GTGGTA
<i>M. conica</i>	ATGTCCT---	---AAATAGA	CG--TAGACC	CGCCTCCAGA	---TGCGACA
<i>M. angusticeps</i>	ATGTCCTAAA	TAGA-----	--CGTAGACC	CGCCTTCAG-	ATGC-----
<i>M. elata</i>	ATGTCCTAAA	TAGA-----	--CGTAGACC	CGCCTTCAG-	ATGC-----
<i>Mitrophora</i>	AAGTCCC--A	T--GACTCCA	CGGTTGAGGG	CCTCGGTGCT	GT-CGCATCA

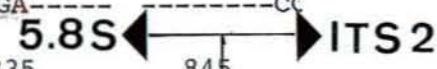


Fig. 3

	1005	1015	1025	1035	1045
<i>M. esculenta</i>	GGTAG- ACTG	AGGGCGTCAA	CCGTGGAGTC	ATGAGGGTAG	AAACCTCCCC
<i>M. crassipes</i>	GGCAG- ACTG	AGGGCGTCAA	CCGTGGAGTC	ATGAGGGTAG	AAACCTCCCC
<i>M. vulgaris</i>	GGTAG- ACTG	AGGGCGTCAA	CCGTGGAGTC	ATGAGGGTAG	AAACCTCCCC
<i>M. dunensis</i>	GGCAG- ACTG	AGGGCGTCAA	CCGTGGAGTC	ATGAGGATAG	AAACCTCCCC
<i>Verpa</i>	AAATATTT CG	TTGCGGTCTA	CTTCAA ACTC	CTAGGAC CC T	AAGCACTTAA
<i>M. conica</i>	GC--- ACCG	AGGCCATCAA	CCGTGGAGTT	ATG-GGATAT	ATAGGC----
<i>M. angusticeps</i>	GACAGC ACCG	AGGCCATCAA	CCGTGGAGTT	ATGGG- ATAT	ATAGGC TTGC
<i>M. elata</i>	GACAGC ACCG	AGGCCATCAA	CCGTGGAGTT	ATGGGTATA-	ATAGGC TTGC
<i>Mitrophora</i>	GATGGC--- G	GGTCT CC TAA	ATTTGGG CTC	TCGGGAGCGG	A-----
	1055	1065	1075	1085	1095
<i>M. esculenta</i>	CTTTG CAAGT	AACAT TGCTC	TGGCAG TTAG	ATCTG CAGGC	CCGACGG TCI
<i>M. crassipes</i>	CTTTG CAAGT	AACAT TGCTC	TGGCAG TTAG	ATCTG CAGGC	GTGCCGG TCI
<i>M. vulgaris</i>	CTTTG CAAGT	AACAT TGCTC	TGGCAG TTAG	ATCTG CAGGC	CCGACGG TCI
<i>M. dunensis</i>	CTTTG CAAGT	AACAT TGCTC	TGGCAG TTAG	ATCTG CAGGC	CTGCCGG TCI
<i>Verpa</i>	CTGTG CCAA-	AAC----- C	CAGAGAT T-G	ACCT-CGGAT	CAGG----- I
<i>M. conica</i>	--TTG CAG-T	AAAAT-G CTC	--AC CTTC-	-TCCAT ACGC	C-----
<i>M. angusticeps</i>	AGT-----	AAAAT G---C	TCAC CT---	-----	---CT CTTC A
<i>M. elata</i>	AGT-----	AAAAT G---C	TCAC CT---	-----	---CT CTCC A
<i>Mitrophora</i>	--TTG CCAG-	----T CGCTT	T-----	-CCCG CAGGC	CAA-----
	1105	1115	1125	1135	1145
<i>M. esculenta</i>	GGGGAT GGAC	CTCCC ACTCG	CAGGCG TCAC	GGCCAC GA-T	AGCGGG CGTI
<i>M. crassipes</i>	GGGGAT GGAC	CTCCC ACTCG	CAGGAG TCAC	GGCCAC GAAT	AGCGGG CGTI
<i>M. vulgaris</i>	GGGGAT CCCC	CTCCC ACTCG	CAGGCG TCAC	GGCCAC GA-T	AGCGGG CGTI
<i>M. dunensis</i>	GGGGAT GGAC	CTCCC ACTCG	CAGGCG TCAC	GGCCAC GA-T	AGCGGG CGTI
<i>Verpa</i>	AGGGAT-- AC	CCGCT GAACT	TAAG-- CAT	ATCA ATAA-G	CGGAG GAGC-
<i>M. conica</i>	---GAT GG--	---CAC AC---	----- C	GGT CGCAG-T	TGCGGG CGTA
<i>M. angusticeps</i>	CACG-----	----- CCG	ATGG CACACC	GGT CGCAG-T	TGCGGG CGTA
<i>M. elata</i>	CACG-----	----- CCG	ATGG CACGAC	AGT TCAG-T	TGCGGG CGTA
<i>Mitrophora</i>	----- GAC	CCCC AG-CG	TAGG CTTAA-	---- ATGAAT	AA- ACACGTI
	1155	1165	1175	1185	1195
<i>M. esculenta</i>	AAACGG AATC	CGAT CCGCC T	TCACGG GTGG	TTGA AGATCC	TTGT GGGCTA
<i>M. crassipes</i>	AAACGG AATC	CGAT CCGCC	TCACGG GTGG	TTGA AGATCC	TTGT GGGCTA
<i>M. vulgaris</i>	AAACGG AATC	CGAT CCGCC T	TCACGG GTGG	TTGA AGATCC	TTGT GGGCTA
<i>M. dunensis</i>	AAACGG AATC	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	AGGCAA AAGC	TG-T CAGA AC	ACAAA AAAAA	C--AAA ACAG	GTA- AAACTI
<i>M. conica</i>	AATT GGAGCC	C----- TTT	TCA-----	---GG ACCC	TTGT GGCCTA
<i>M. angusticeps</i>	AATT GGAGCC	CTTT T---	-----	---C AGGACC	TTGT GGCCTA
<i>M. elata</i>	AATT GGAGCC	CTTT T---	-----	---C AGGACC	TTGT GGCCTA
<i>Mitrophora</i>	GGGGG AGATG	GTTT TATGAC	GCT CGAACG	GCAT GCCCC	CGGAG TACCA
	1205	1215	1225	1235	1245
<i>M. esculenta</i>	GCAAC CCCTA	AACAT ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>M. crassipes</i>	ACAAC CCCTA	AACAC ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>M. vulgaris</i>	GCAAC CCCTA	AACAT ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	TCAAC AAACGG	GAT CT-CTT G	GTT CCACAT	C-GAT GAAGA	-AC GACCGA
<i>M. conica</i>	GCAT CCACCA	TACAC ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>M. angusticeps</i>	GCAT CCACCA	TACAC ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>M. elata</i>	GCAT CCACCA	TACAT ATTTT	GACCT CGGAT	CAGGT AGGGA	TAC CCGCTGA
<i>Mitrophora</i>	GAGGG CGCAA	TGT GCG-TTC	AA----- AGAT	TCGAT G----	-AT CTACTGA

ITS2 ← → 25S

Fig. 3

	1255	1265	1275
<i>M. esculenta</i>	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GG-----
<i>M. crassipes</i>	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GGAGG-----
<i>M. vulgaris</i>	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GG-----
<i>M. dunensis</i>	-----	-----	-----
<i>Verpa</i>	A-----AT	G-CGATAAGT	A-ATGTGAAT
<i>M. conica</i>	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GC-----
<i>M. angusticeps</i>	ACTTAAGCAT	ATCAATAAGC	GGAGGAAAGA
<i>M. elata</i>	ACTTAAGCAT	ATCAA-----	-----
<i>Mitrophora</i>	ATTC-----T	G-----	-----

Fig. 4

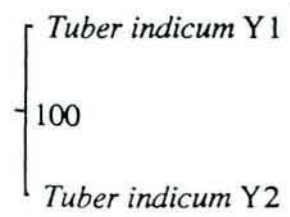
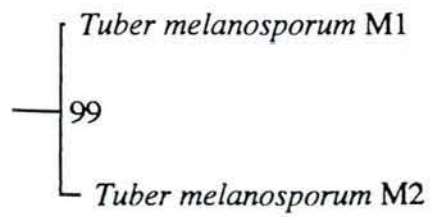
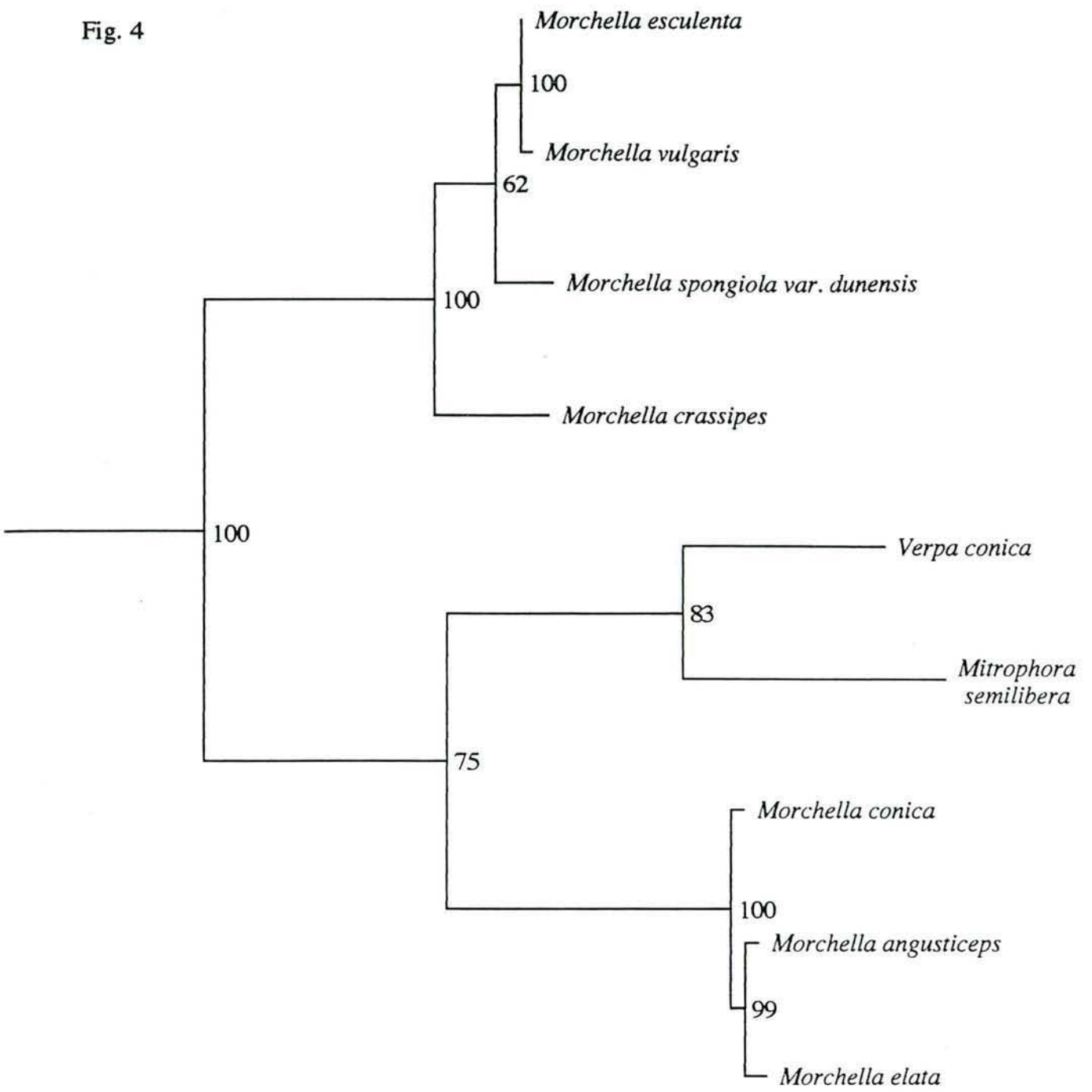


Fig. 5

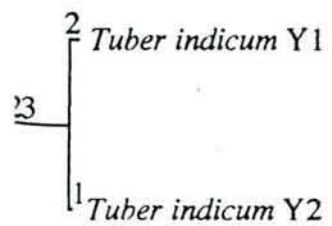
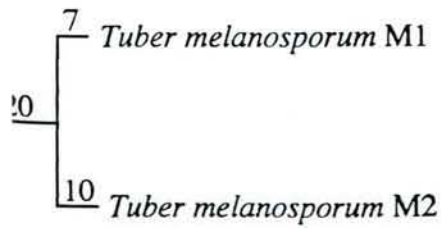
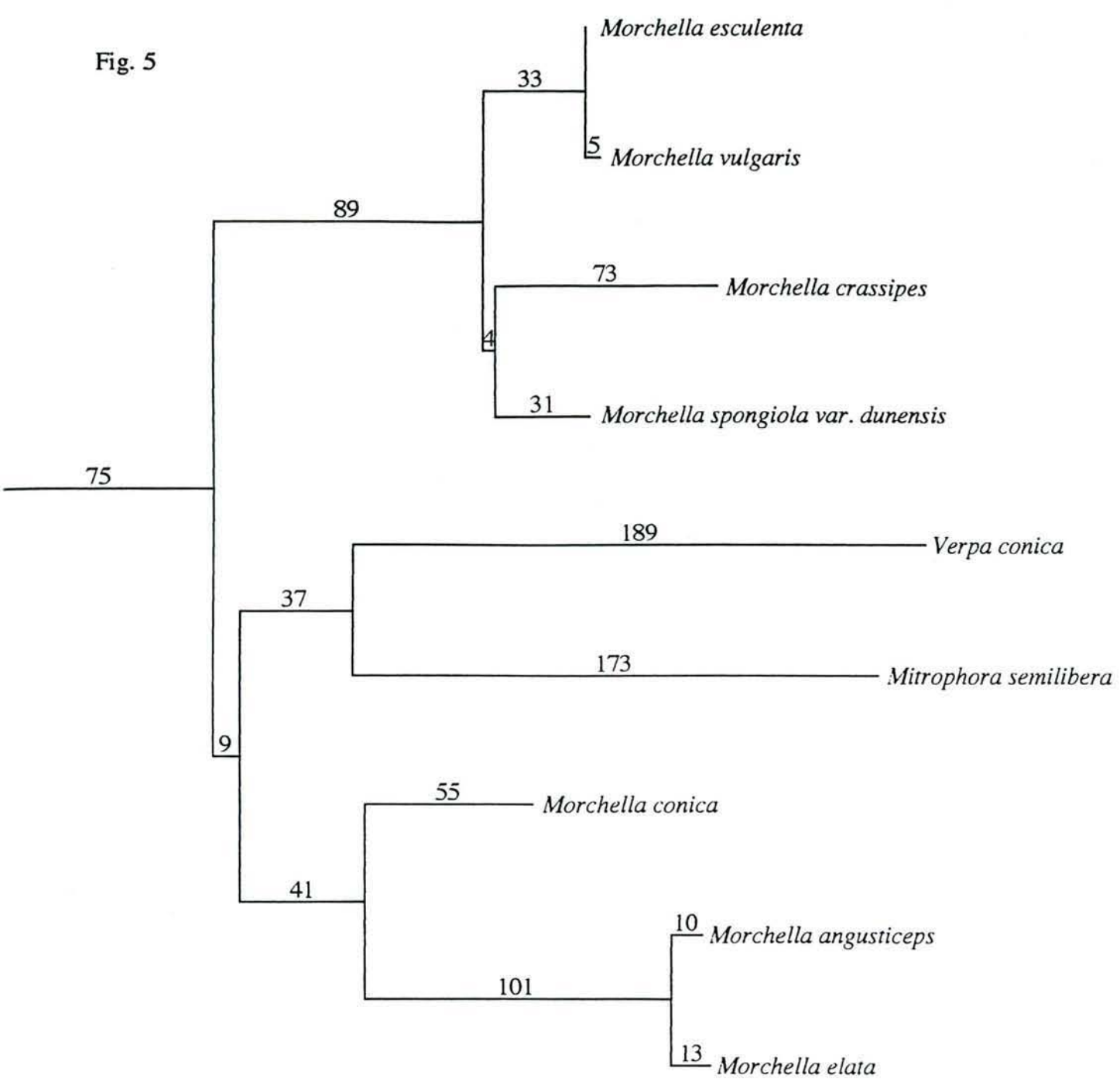


Table 1. Isolates used in this study, and respective ITS lengths

Strain	Legator	Origin	Ref.	ITS length
<i>Disciotis venosa</i> Her 1	Boyle	Germany 1994	10393	1005 bp
<i>Disciotis venosa</i> Noyon	Clowez	France	<i>Exsiccata</i>	1003 bp
<i>Gyromitra esculenta</i> 1	Kost	France 1989	10400	841 bp
<i>Gyromitra esculenta</i> Her 5	Boyle	Germany 1994	10401	840 bp
<i>Gyromitra infula</i> m954 (3)	Arnold	UK 1992	10408	840 bp
- (4)	-	-	10402	843 bp
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (1)	Arnold	Germany 1992	10485	840 bp
- (3)	-	-	10486	840 bp
- (4)	-	-	10487	842 bp
- (5)	-	-	10488	840 bp
<i>Mitrophora semilibera</i> Mi 1	Kost	Germany 1989	PC	839 bp
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 1	Wipf	Germany 1995	10397	845 bp
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 2	Wipf	Germany 1995	10398	840 bp
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 3	Wipf	Germany 1995	10399	840 bp
<i>Morchella angusticeps</i> fungi perf.	Amir	USA	10461	746 bp
<i>Morchella angusticeps</i> Penn. State	Amir	Canada 1975	10462	748 bp
<i>Morchella conica</i> Co (1)	Luschka	Switzerland 1995	10464	750 bp
- (2)			10465	751 bp
- (3)			10466	750 bp
- (4)			10467	749 bp
<i>Morchella conica</i> m889	Arnold	Germany 1991	10478	749 bp
<i>Morchella conica</i> MoIs16	Amir	Israel 1993	10480	750 bp
<i>Morchella conica</i> MoIs18	Amir	Israel 1993	10481	746 bp
<i>Morchella conica</i> MoIs5	Amir	Israel Sept. 1993	10479	748 bp

<i>Morchella costata</i> (Pas de Calais)	Buscot	France 1995	<i>Exsicata</i>	748 bp
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277	Amir	USA	10458	1158 bp
<i>Morchella crassipes</i> Her (1)	Boyle	Germany 1994	10459	1229 bp
- (2)			10460	1228 bp
<i>Morchella elata</i> 1	Luschka	Switzerland 1995	10482	751 bp
<i>Morchella elata</i> Aus I	Faris	Australia 1993	PC	749 bp
<i>Morchella elata</i> Aus II	Faris	Australia 1993	PC	749 bp
<i>Morchella elata</i> NZ	Cole	New-Zealand 1996	PC	749 bp
<i>Morchella elata</i> SH 2	Philipoussis	Greece	PC	749 bp
<i>Morchella elata</i> SH 3	Philipoussis	Greece	PC	752 bp
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785	Amir	USA	10370	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> (A0)	Kost	Germany 1990	10372	1158 bp
- (B0)			10373	1158 bp
- (0A8)			10386	1158 bp
- (0A9)			10387	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> (A7)	Buscot	France 1987	10374	1157 bp
- (B7)			10375	1159 bp
- (7A6)			10391	1159 bp
- (7A7)			10414	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> Costa-Rica (1)	Melendez	Costa-Rica	<i>Exsicata</i>	1157 bp
- (2)	Melendez	Costa-Rica	<i>Exsicata</i>	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> (Maroc)	Clowez	Maroco	<i>Exsicata</i>	1156 bp
<i>Morchella esculenta</i> (aubépines)	Clowez	France	<i>Exsicata</i>	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> (aulnes)	Clowez	France	<i>Exsicata</i>	1155 bp
<i>Morchella esculenta</i> (Brülis)	Clowez	France	<i>Exsicata</i>	1158 bp
<i>Morchella esculenta</i> (7B1)	Wipf	France 1987	10415	1158 bp
- (7B2)			10416	1158 bp
- (7B3)			10417	1158 bp

-	(7B4)			10418	1159 bp
<i>Morchella esculenta</i>	m19	Arnold	Germany 1955	10371	1157 bp
<i>Morchella hortensis</i>		Philipoussis	Greece	PC	1231 bp
<i>Morchella spongiola</i>	var. <i>dunensis</i> (PdC)	Buscot	France 1995	<i>Exsicata</i>	1228 bp
-	(Du1)			10471	1225 bp
-	(Du2)			10472	1227 bp
-	(Du3)			10463	1227 bp
<i>Morchella spongiola</i>	var. <i>dunensis</i> TSM	Clowez	France 1995	<i>Exsicata</i>	1225 bp
<i>Morchella spongiola</i>	var. <i>dunensis</i> QUI	Clowez	France 1995	<i>Exsicata</i>	1226 bp
<i>Morchella vulgaris</i>	1	Wipf	France 1995	<i>Exsicata</i>	1157 bp
<i>Morchella vulgaris</i>	2	Wipf	France 1995	<i>Exsicata</i>	1157 bp
<i>Morchella vulgaris</i>	3	Wipf	France 1996	<i>Exsicata</i>	1159 bp
<i>Verpa conica</i>	(1)	Kost	Germany 1989	10403	748 bp
-	(3)			10392	750 bp

Table 2 : GenBank accession numbers.

Strain	GenBank accession numbers
<i>Mitrophora semilibera</i>	AF 008233
<i>Morchella angusticeps</i> Penn State	AF 000970
<i>Morchella conica</i> Co1	U 51852
<i>Morchella crassipes</i>	AF 008232
<i>Morchella elata</i> 1	U 61390
<i>Morchella esculenta</i> A7	U 51851
<i>Morchella spongiola</i> var. <i>dunensis</i>	AF 008231
<i>Morchella vulgaris</i>	AF 000971
<i>Verpa conica</i>	AF 008230

Table 3 : restriction fragments analysis of the rDNA spacer ITS digested with *Eco RI + rsa I*.

	Fragment size (bp)														Sum (bp)
	518	430	394	384	347	285	242	223	203	190	152	121	107	70	
<i>M. angusticeps</i>		X							X		X				785
<i>M. conica</i>		X							X		X				785
<i>M. costata</i>		X							X		X				785
<i>M. elata</i>		X							X		X				785
<i>Verpa conica</i>					X			X		X					760
¹⁰⁹ <i>Gyromitra esculenta</i>					X				X			X		X	741
<i>Gyromitra infula</i>					X				X			X		X	741
<i>Mitrophora semilibera</i>				X			X			X					816
<i>Disciotis venosa</i>						X			X		X		X		747
<i>M. crassipes</i> ATCC	X					X			X			X		X	1197
<i>M. esculenta</i>	X					X			X			X		X	1197
<i>M. vulgaris</i>	X					X			X			X		X	1197
<i>M. crassipes</i> Her	X		X						X			X			1239
<i>M. hortensis</i>	X		X					X							1135
<i>M. spongiola</i> var. <i>dunensis</i>	X						X			X					950

Tableau 10: Longueur de la région ITS des souches non répertoriées dans la publication 5.

<i>Souche</i>	Légateur	Origine	Réf.	Long. ITS
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (6)	Arnold	Germany 1992	CP	840 bp
- (7)			10407	841 bp
- (8)			10396	842 bp
<i>Morchella esculenta</i> Mo24/2	Buscot	France 1990	10385	1160 pb
<i>Morchella esculenta</i> (0A10)	Kost	Allemagne 1990	10388	1157 pb
- (0A11)			10389	1159 pb
- (0A12)			10390	1158 pb
- (C0)			10432	1159 pb
- (D0)			10433	1156 pb
- (E0)			10453	1158 pb
<i>Morchella esculenta</i> (7B10)	Buscot	France, 1987	10423	1158 pb
- (7B6)			10419	1158 pb
- (7B7)			10420	1158 pb
- (7B8)			10421	1157 pb
- (7B9)			10422	1158 pb
- (7B12)			10425	1157 pb
- (7B13)			10426	1158 pb
- (7B20)			10427	1157 pb
- (7B24)			10428	1157 pb
- (7B25)			10429	1159 pb
- (7B26)			10430	1158 pb
<i>Morchella esculenta</i> (C7)	Buscot	France, 1987	10431	1158 pb
- (D7)			10434	1157 pb
- (E7)			10454	1158 pb
<i>Morchella esculenta</i> (A0A7)	Buscot	Heterokaryotic Strain	10376	1158 pb
- (A0B0)			10377	1159 pb
- (A0B7)			10378	1159 pb
- (A7B7)			10379	1157 pb
- (B0A7)			10380	1159 pb
- (BOB7)			10381	1158 pb

**Deuxième Partie: Etudes expérimentales
de la biologie des morilles**

Chapitre VI: Biologie de la morille



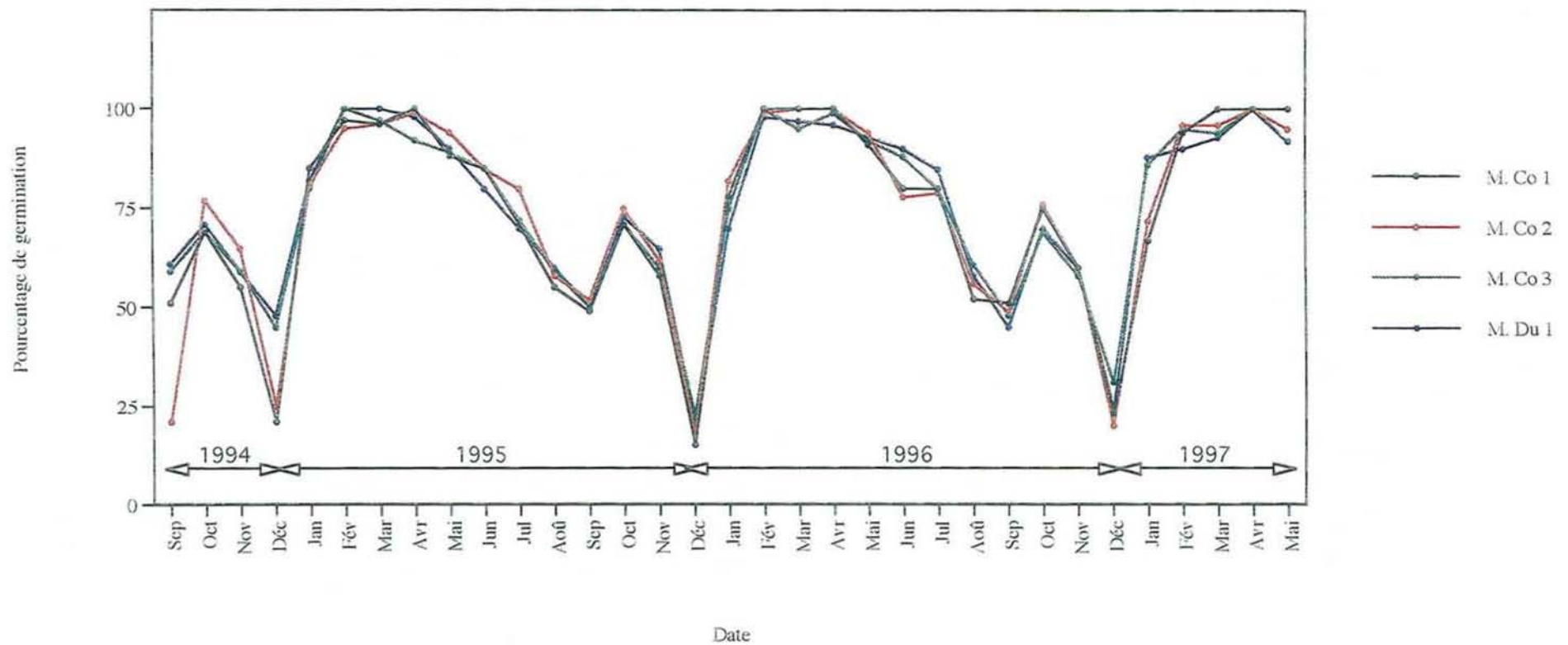


Figure 9 : Variabilité de l'aptitude de 4 sporées de morille à germer en fonction de de la période de l'année.

6.1 Variabilité du taux de germination des spores de morilles selon l'époque de l'année

Les variations endogènes saisonnières du taux de germination de spores ont été similaires pour les 4 sporées utilisées (Fig; 9). Une aptitude germinative plus élevée a été notée entre les mois de février et de mai, et, dans une moindre mesure, aux mois d'octobre et novembre. Ce résultat s'est répété durant les 3 années sur lesquelles l'étude a porté.

En conditions naturelles des spores de morilles inoculées artificiellement dans le sol ne sont capables de germer que durant la période vernale (Schmidt, 1983). *In vitro* le pic de germination le plus élevé est observé à la même période, qui correspond à l'époque de la fructification des morilles en conditions naturelles (février-mars-avril). Un second pic de germination moins élevé, est observé en automne, saison à laquelle les morilles sont exceptionnellement capables de fructifier (Berthet, 1983; Estève, 1986).

Les variations saisonnières d'aptitude à la germination mises en évidence dans ce travail se calquent sur le rythme décrit par Buscot (1987) en ce qui concerne l'aptitude à la formation de sclérotés. Au total, notre étude confirme bien l'existence d'un rythme endogène chez la morille, même si cette propriété n'a pas été mentionnée dans les travaux relatifs à la production d'ascocarpes en conditions contrôlées (Ower *et al.*, 1986).

6.2 La relation morille-arbre

6.2.1 Etude cytologique sur matériel de terrain

L'association couramment décrite entre *M. vulgaris* et le frêne a été retenue comme modèle pour l'étude de terrain des relations rhizofongiques de la morille. Le matériel a été prélevé en avril 1995 et 1996 dans la région de Noyon (Oise). L'appareil mycélien souterrain observé sous les ascocarpes matures examinés présentait un développement réduit. En particulier, il n'a pas été possible de mettre en évidence des rhizomorphes reliant la base des ascocarpes aux racines associées. De même, les manchons mycéliens entourant les racines étaient absents ou peu développés. Cette observation est conforme à celle de Buscot (1989), qui a décrit une disparition progressive des manchons mycéliens au fur et à mesure de la maturation des ascocarpes.

Dans les cas où ils ont été observés, de tels manchons englobaient des réseaux de racines fines, dont la partie terminale présentait des déformations (Fig. 10 a & b). La surface de ces racines était recouverte d'un chevelu mycélien parfois dense, mais ne possédant pas la structure d'un manteau ectomycorhizien typique (Fig. 10 c). Les coupes réalisées dans de telles racines ont montré la présence de nombreuses hyphes intracellulaires dans les assises du cortex (Fig. 10 d & e).

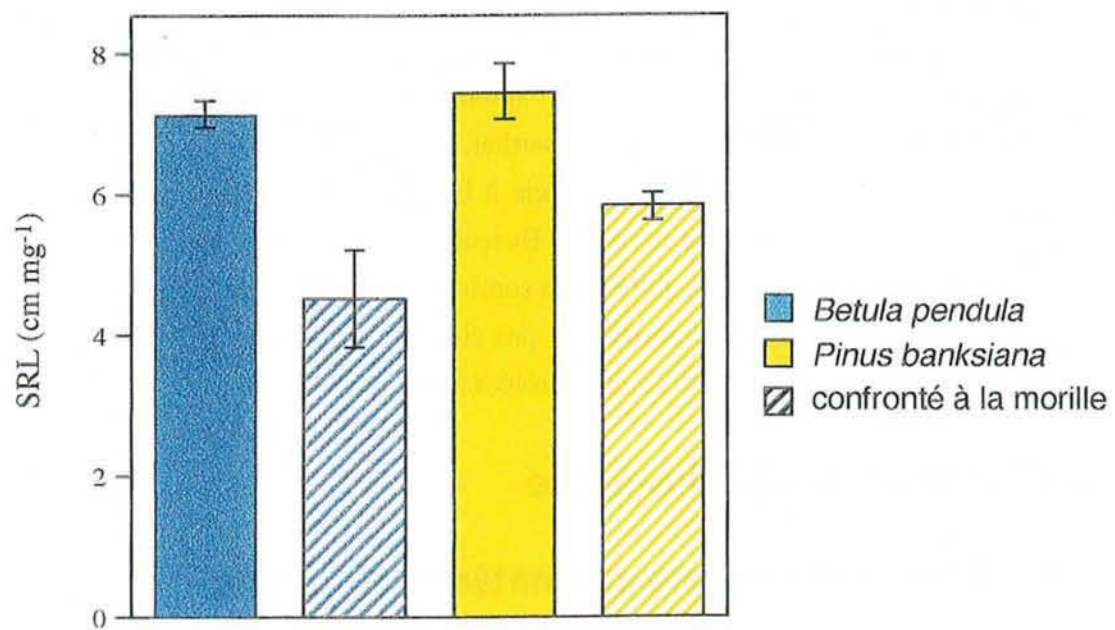
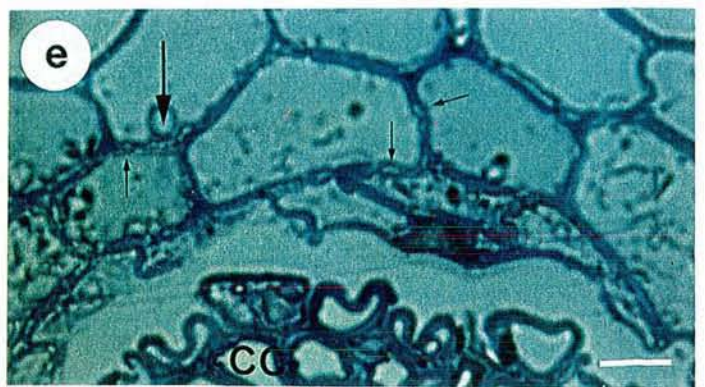
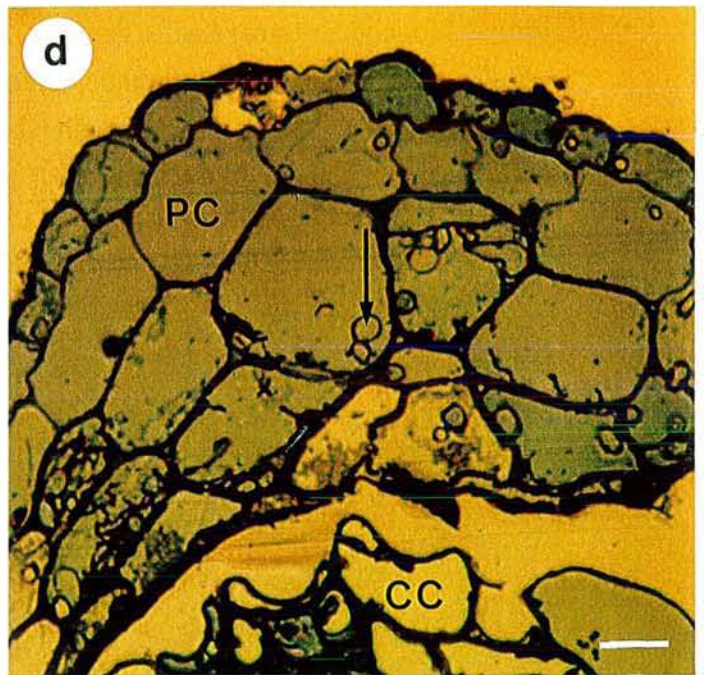


Figure 11: Influence de l'inoculation de la morille sur la longueur spécifique racinaire (SRL).

Figure 10: Morphologie et anatomie de l'association entre *Morchella esculenta* et des racines de frêne (*Fraxinus excelsior*). a, aspect général de l'association (longueur du trait, 400 μm); b, aspect général des racines après séparation du manchon mycélien (longueur du trait, 240 μm); c, vue de détail d'une racine recouverte d'un chevelu mycélien (longueur du trait, 96 μm); d & e, coupes transversales dans les racines (PC, cellules du parenchyme cortical; CC, cellules du cylindre central; grandes flèches, hyphes de morille intracellulaires; petites flèches, hyphes de morille intercellulaires présentant l'aspect d'un réseau de Hartig rudimentaire; longueur du trait, 4,8 et 3,7 μm respectivement).



Les cellules des tissus ainsi envahis présentaient une faible vitalité. Dans certains cas, une croissance intercellulaire du champignon a été observée, dont l'aspect évoque un réseau de Hartig réduit et rudimentaire (Fig. 10 e).

Cette observation d'une association de la morille avec des tissus racinaires corticaux dont la durée de vie est par essence limitée est difficile à interpréter. En effet, il peut tout aussi bien s'agir d'un parasitisme léger que d'un présaprophytisme. La présence d'une ébauche de réseau de Hartig indique également la possibilité d'une association ectendomycorhizienne. Il est à souligner que chez des ascomycètes mycorhiziens comme les différentes espèces de truffe, Agerer (1987-1996) a montré des réseaux de Hartig peu structurés et d'extension limitée. Dans le cas de la morille, les mycorhizes sur résineux décrites par Buscot et Kottke (1990) et par Buscot (1994) présentaient également un réseau de Hartig peu développé.

6.2.2 Cultures associées

Publication n°6

Recent advances in ecology and systematics of morels.

*Wipf, D., S. Koschinsky, P. Clowez, J.C. Munch, B. Botton & F. Buscot
Cryptogamie Mycologie 18, 95-109*

Cet article présente à la fois une synthèse des avancées récentes dans le domaine de la biologie et de l'écologie des morilles, et des résultats nouveaux obtenus par nous-mêmes et nos partenaires allemands (F. Buscot et S. Koschinsky) dans l'étude expérimentale de l'association morille-plante supérieure.

Nos résultats propres montrent que la morille ne peut survivre seule sur un milieu composé de tourbe, mais en devient capable en présence d'une plante supérieure compatible, dont elle modifie le développement de façon spécifique. Ainsi, si le développement des parties aériennes du bouleau et du pin est semblablement inhibé en présence du champignon, l'effet sur le système racinaire des deux espèces de plantes est différent. Dans le cas du pin, on observe une forte diminution de la croissance en longueur des racines. Chez le bouleau, cette croissance n'est pas affecté, mais une diminution significative de la "longueur spécifique des racines" (SRL ou Specific Root Length) (Fitter, 1985), indique par contre une altération de l'anatomie racinaire sous l'effet de la morille (Fig. 11). En l'état actuel des connaissances, ce type d'effet, comparable à celui de l'infection de plantes par des nématodes (Fitter, 1985) ou de certains champignons mycorhiziens, reste difficile à intégrer dans l'interprétation du bilan écophysologique d'une association rhizofongique (Herrmann, communication personnelle).

La morphologie de l'interaction entre mycélium de morille et racine varie elle même de façon spécifique. Dans le cas du bouleau, il s'agit de petits manchons étroitement imbriqués dans le système racinaire, alors qu'avec le pin, de gros sclérotés sont formés à proximité mais non au contact direct des racines. L'analyse PCR réalisée a en outre montré que cette spécificité concerne également le champignon puisque, dans nos conditions expérimentales, seule *M. esculenta* s'est développée en présence de *Betula pendula* et seule *M. elata* s'est développée en présence de *Pinus banksiana*.

En ce qui concerne la nature des associations obtenues, le fort taux de mortalité observé en fin d'expérience en particulier chez *P. Banksiana* indique un parasitisme de type nécrotrophe. Cependant, il faut souligner le caractère particulier car artificiel de telles cultures. Les travaux de nos partenaires montrent d'ailleurs que la coinoculation de bactéries associées suffit à modifier l'effet de la morille sur un système racinaire.

Ainsi, si nos résultats confirment que l'association avec une plante peut être essentielle pour un développement pérenne de la morille (Buscot, 1992a et 1993), la nature des interactions observées est elle à interpréter avec prudence.

Les expériences de co-cultures menées parallèlement par les deux groupes avec différentes espèces de morilles et de plantes montrent que l'association à une plante supérieure peut être spécifique. Cependant, le fait que des facteurs bactériens puissent modifier la nature de telles associations incite à une utilisation prudente de cette spécificité d'association comme critère de caractérisation des espèces de morilles.

RECENT ADVANCES IN ECOLOGY AND SYSTEMATICS OF MORELS.

Daniel WIPF¹, Stephanie KOSCHINSKY², Philippe CLOWEZ³, Jean Charles MUNCH^{2*},
Bernard BOTTON¹ and François BUSCOT²

¹Université Henri Poincaré, Laboratoire de Biologie Forestière, Unité de Physiologie Mycorhizienne,
BP 239, F-54506 Vandœuvre-les-Nancy, France.
wipf@sbiol.u-nancy.fr

²Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft,
Bundesallee 50, D-38116 Braunschweig, Germany
³46, rue Jeanne d'Arc, F-60400 Suzoy, France

*Present address: Institut für Bodenökologie, GSF-Forschungszentrum für Umwelt
und Gesundheit GmbH, Neuherberg Postfach 1129, D-85758 Oberschleißheim, Germany

RÉSUMÉ — Le présent article fait la synthèse des avancées récentes dans le domaine de la biologie et de l'écologie des morilles avant de présenter des résultats nouveaux, susceptibles, d'éclairer le débat sur la notion d'espèce dans ce groupe dont la systématique est controversée. Des expériences de confrontations menées avec différentes "espèces de morilles" montrent que l'association à une plante supérieure peut être spécifique. Cependant, le fait que des facteurs bactériens puissent modifier la nature de telles associations incite à une utilisation prudente de telles spécificités d'association comme critère de caractérisation des espèces de morilles. Parmi les approches modernes, c'est l'analyse de l'espaceur ITS de l'ADN ribosomal qui est la mieux adaptée à cette caractérisation et à la révision systématique des *Morchellaceae*. Des exemples sont fournis au sein du groupe des morilles rondes.

ABSTRACT — The paper summarises recent advances in the field of the biology and ecology of morels and presents new results aiming to highlight the species definition in this group with controversial systematics. Experiments using different morel species show that the association with plants can be specific. However, as bacteria may modify their nature, the specificity of the associations must be used cautiously as criterion to characterise morel species. Within the modern approaches, the analysis of the ITS-region appears as the most adapted to characterise true species and to revise the systematics of the *Morchellaceae*. Examples within the group of the yellow morels are given.

KEY WORDS: *Morchella*, ecology, systematics, associations with plants, review

MOTS CLES: *Morchella*, écologie, systématique, associations avec des plantes, revue

Morels are often one of the first spring edible mushrooms collected in temperate regions (Weber, 1995). The stipitate mitrate ascomata with folded to spongiform hymenium make the genus *Morchella* easy to define (Chadefaud, 1960). In contrast, the fact that Korf (1973) and Jacquetant (1984) distinguished respectively 3 and 28 species illustrates

the debatable species definition. The basic difficulty here is that within each taxon, the ascomata display high macroscopic morphological variations (fig. 1), whereas the microscopical features of the hymenium are remarkably homogenous within all *Morchellaceae*. In this context, Gessner (1995) recently underlined the importance to consider also biological and ecological features in order to distinguish form variations respectively reflecting ecotypes and true species. The present article constitutes an attempt to follow this line of thought. A review of known biological and ecological features and the presentation of new results on the specificity of associations between morels and plants will be used to highlight the most recent advances on systematics of this fungal group which base on molecular biological investigations.

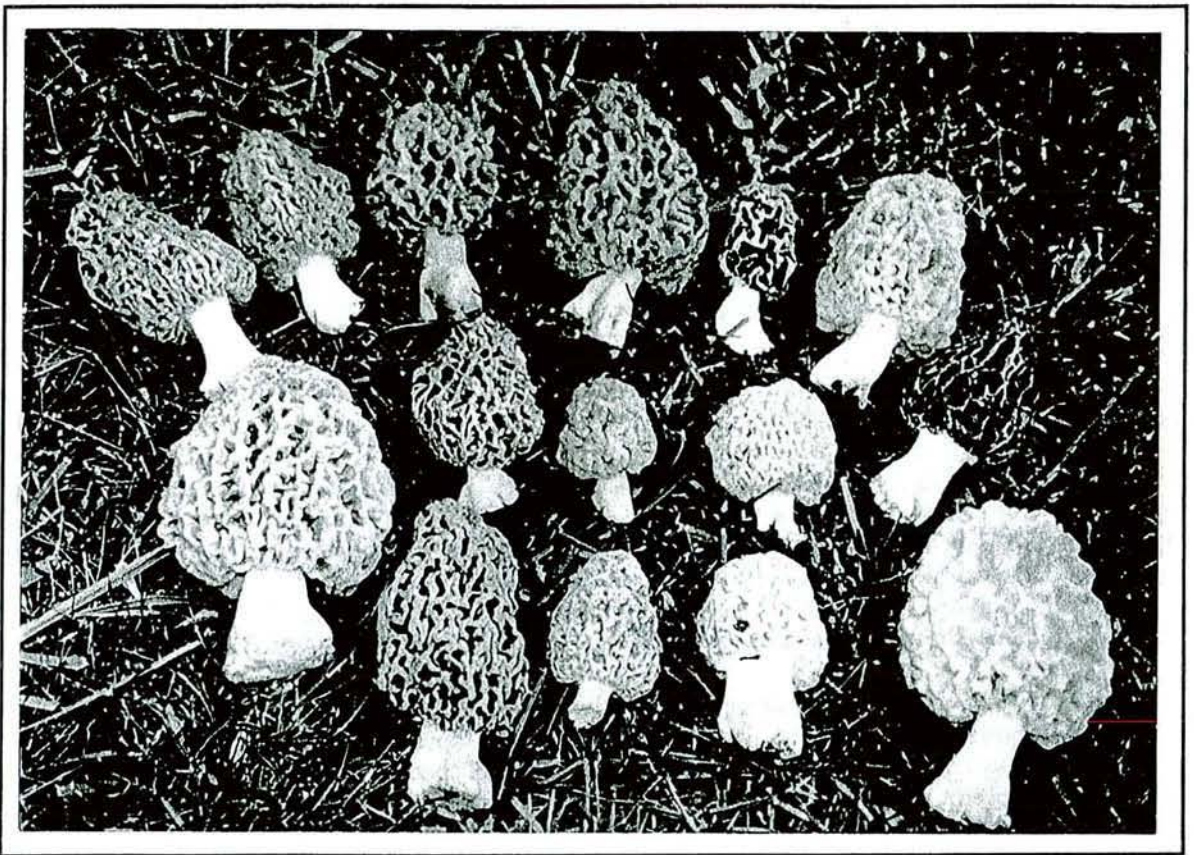


Fig. 1. — Morphological variability of fruitbodies within the taxon *Morchella vulgaris*.

BIOLOGICAL AND ECOLOGICAL CYCLES

The observation by Molliard (1905) and Matruchot (1909) that morels fruit at the expense of preformed sclerotia constituted a crucial step of the ancient effort to elucidate morel biology and ecology. The central biological role of sclerotia was confirmed by the experimental work of Ower (1982 & 1986), which resulted in mastering the fructification under culture conditions. In addition, ecophysiological field investigations allowed Buscot (1989) to demonstrate the biennial life cycle of morels in temperate regions and revealed that sclerotia constitute the mycelial structure which overlives the cold season and provides the nutrients for the ascomata development in early spring. Both latter functions of sclerotia were confirmed by biochemical (Buscot & Bernillon, 1991) and experimental ecophysiological investigations (Buscot, 1993), which also supported the observation by Mayr (1982) that morels form two types of sclerotia. The first type represents the storage and overlive structure described above, while the second one can be considered as abortive ascomatal primordia.

A second crucial step in the elucidation of morel biology was the hypothesis by Hervey *et al.* (1978) and its confirmation by Volk and Leonard (1989) that the mycelium can become heterokaryotic after forming vegetative anastomoses. In their representation of the life cycle (fig. 2), the latter authors considered that only sclerotia formed by such heterokaryotic mycelium, which they termed secondary mycelium, are able to produce ascomata (Volk & Leonard, 1990). Buscot (1993) showed that heterokaryons are being formed under low nutrient availability, while monosporal strains segregate when cultivated on nutrient rich media. He related this duality of mycelial somatic interactions with the two ecological strategies (see fig. 3) which morels show in nature (Buscot, 1992a). Within the so called "pioneer strategy", morels behave as ruderal organisms, colonising temporary recently disturbed soils on which they display a high fructification abundance (Kaul, 1975; Turnau, 1984, 1987; Carpenter *et al.*, 1987; Duchesne & Weber, 1993). In the so called "perennial strategy", they grow in stable ecosystems over several years and form fruitbodies only sparsely. Considering the effective nutrient availability in both ecological situations, Buscot (1992a) hypothesised that non self incompatibility between monosporal mycelial strains should be enhanced in the pioneer strategy, while heterokaryons should predominate in the perennial strategy. He related the homokaryotic stage with the saprotrophic nutrition in the pioneer strategy and respectively the heterokaryon formation with the capability to form trophic associations with plant roots in the perennial strategy (see below association with roots). Thus, as is summarised in figures 2 and 3, Volk and Leonard (1990) considered heterokaryosis from the point of view of its role for the reproductive cycle, while Buscot regarded it as a somatic feature allowing the fungus to adapt to an ecological situation marked by enhanced competition for nutrient and complex associations with other organisms.

Additionally to describing morel sclerotia, Molliard (1905) also established a link between the anamorph *Costantinella cristata* and the conidial stage of *Morchella elata*. Paden (1972) confirmed this observation and Gams (pers. communication) obtained conidia of *M. elata* in pure culture. Thus, this feature can be considered as well established. To our knowledge however, *M. elata* is the only morel taxon in which conidia were described and as conidial germination has never been reported, their biological function remains unclear. This conidial stage has been included in the biological life cycle proposed by Volk and Leonard (1990, see fig. 2).

ASSOCIATIONS WITH HIGHER PLANTS IN NATURE

The morel fidelity to vegetation types and to particular plant species is well known by morel hunters and is well documented (table 1). This feature was also largely used for species characterisation by authors such as Jacquetant (1984), who distinguishes a great number of taxa in morels. For example, within the yellow morels (*sectio adnatae* sensu Jacquetant), an association with sand dune vegetation is a crucial characteristics to identify *M. spongiola* var. *dunensis* (Romagnesi, 1963) and respectively, an occurrence in a ash tree forest is a helpful even if not a definitive criterion to characterise *M. vulgaris* (Clowez, 1992). Nevertheless, several of the described associations of morels with plants have to be interpreted cautiously for two reasons. Firstly, within mixed vegetation types, the exact connection to a specific plant species was often not verified. Secondly, the nature of the associations was mostly not investigated. In certain cases however, connections between ascomata and plant roots or rhizomes could be traced and the kind of association characterised. The spectrum of such thoroughly characterised associations appeared to range from parasitism to ectomycorrhizal symbiosis (tab. 2). In the latter case, field observations suggest that the mycorrhizal formation occurs in spring at the same time as fruiting (Buscot & Kottke, 1990; Buscot, 1994) and represents the beginning of a new vegetative cycle within the perennial strategy (Buscot 1992a).

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS ON ASSOCIATIONS WITH PLANTS

While the potential to parasitism was confirmed experimentally, the formation of true mycorrhizas under controlled conditions was not successful until now (Buscot, 1992b). Nevertheless, with seedlings of *Picea abies*, the author obtained formation of mycorrhiza-like modified short rootlets after inoculation of *M. esculenta* precultivated on a nitrogen rich medium which also enhanced the proliferation of two bacteria (*Bacillus circulans* and *Acinetobacter johnsonii*), probably originating from the spore surface (Fig. 4). Complementary assays to highlight these results are presented here briefly.

First series of assays were performed in a gnotobiotic culture system in which axenic root systems of Norway spruce seedlings were confronted with homo- or heterokaryotic strains of *M. esculenta* and/or the bacteria isolates mentioned above (for the method, see Buscot 1992 b). The experiments showed clearly that only the morel is able to induce root modifications, as control plants and plants inoculated only with the bacteria never formed modified roots. In all assays inoculated with morel strains, the formation of mycorrhiza-like modified short roots with generally limited growth was induced (fig. 5a & c). In few cases, the modified roots displayed a prolonged growth, which conferred a club-shape to them (fig. 5a). Co-inoculation with the morel and the bacteria appeared to enhance this latter event (fig. 5b & d). Furthermore, confirming the above mentioned hypothesis of a link between heterokaryosis and the capability of association with roots in nature (Buscot, 1992 a), the production of both mycorrhiza-like and club-shaped roots was clearly higher in case of inoculation with a heterokaryotic than with a monosporal strain (fig. 5). The clearest morphological effect was obtained with polysporal inoculates (fig. 4).

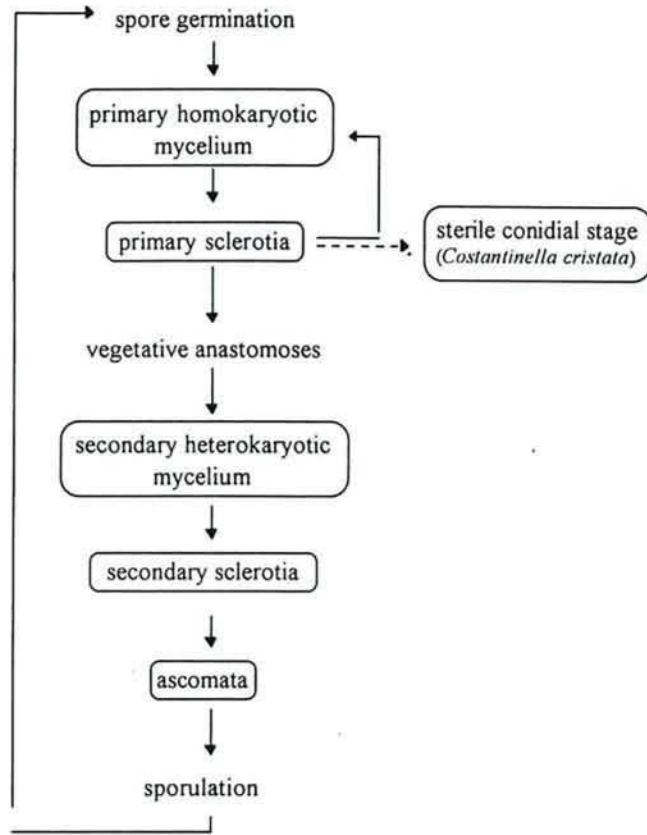


Fig. 2. — Biological life cycle of morels according to Volk and Leonard (1990).

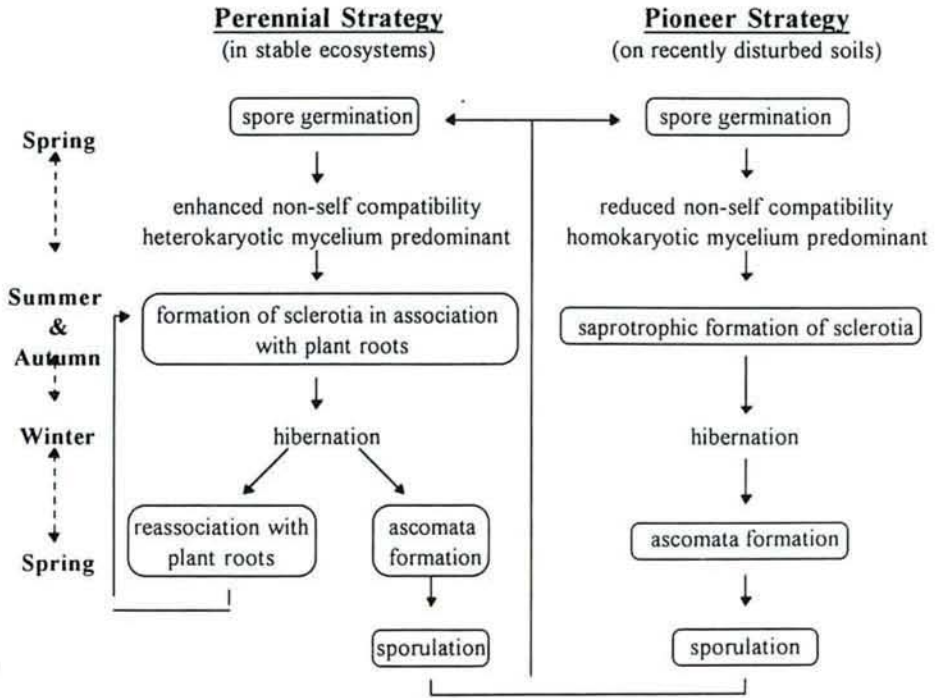


Fig. 3. — Biological and ecological life cycle of morels according to Buscot (1992).

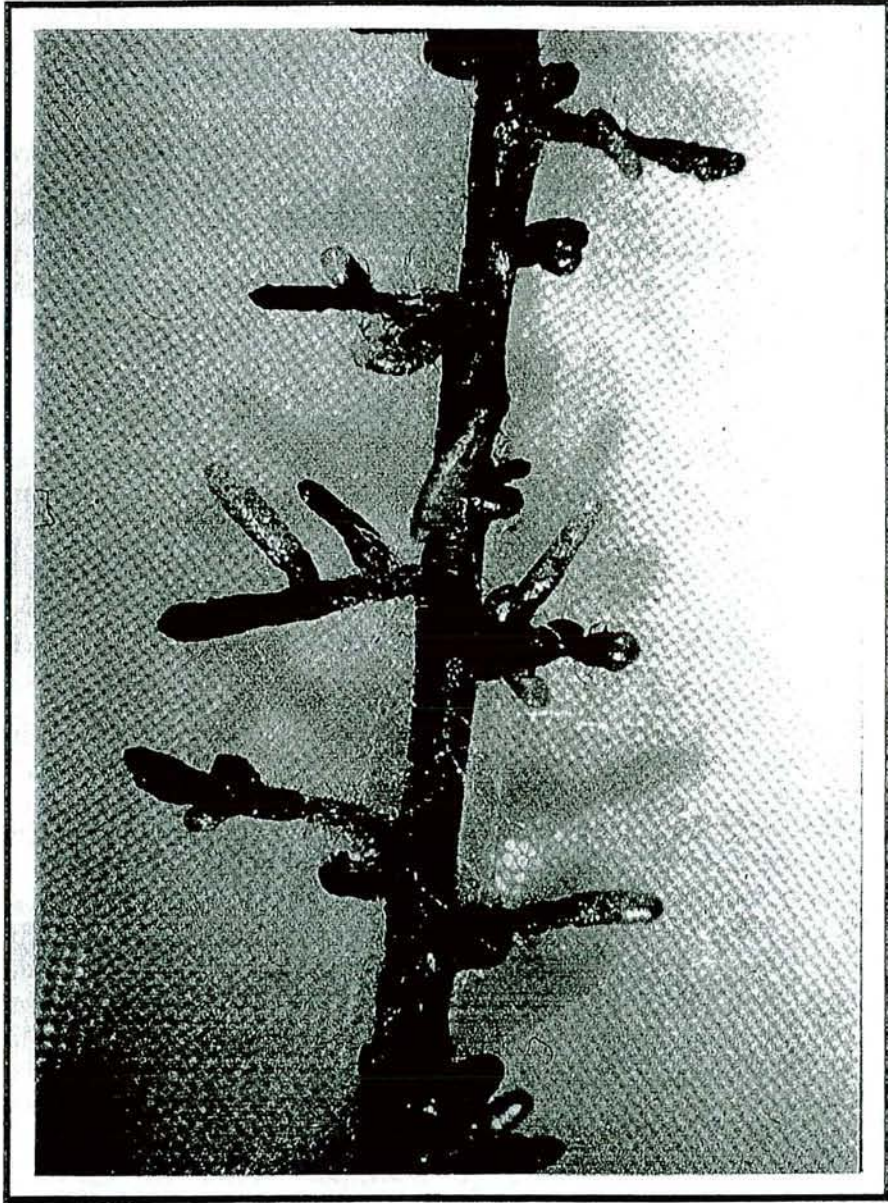


Fig. 4 — Mycorrhiza-like modified short roots of a Norway spruce seedling (*Picea abies*) infected with a polysporal inoculate of *Morchella esculenta*

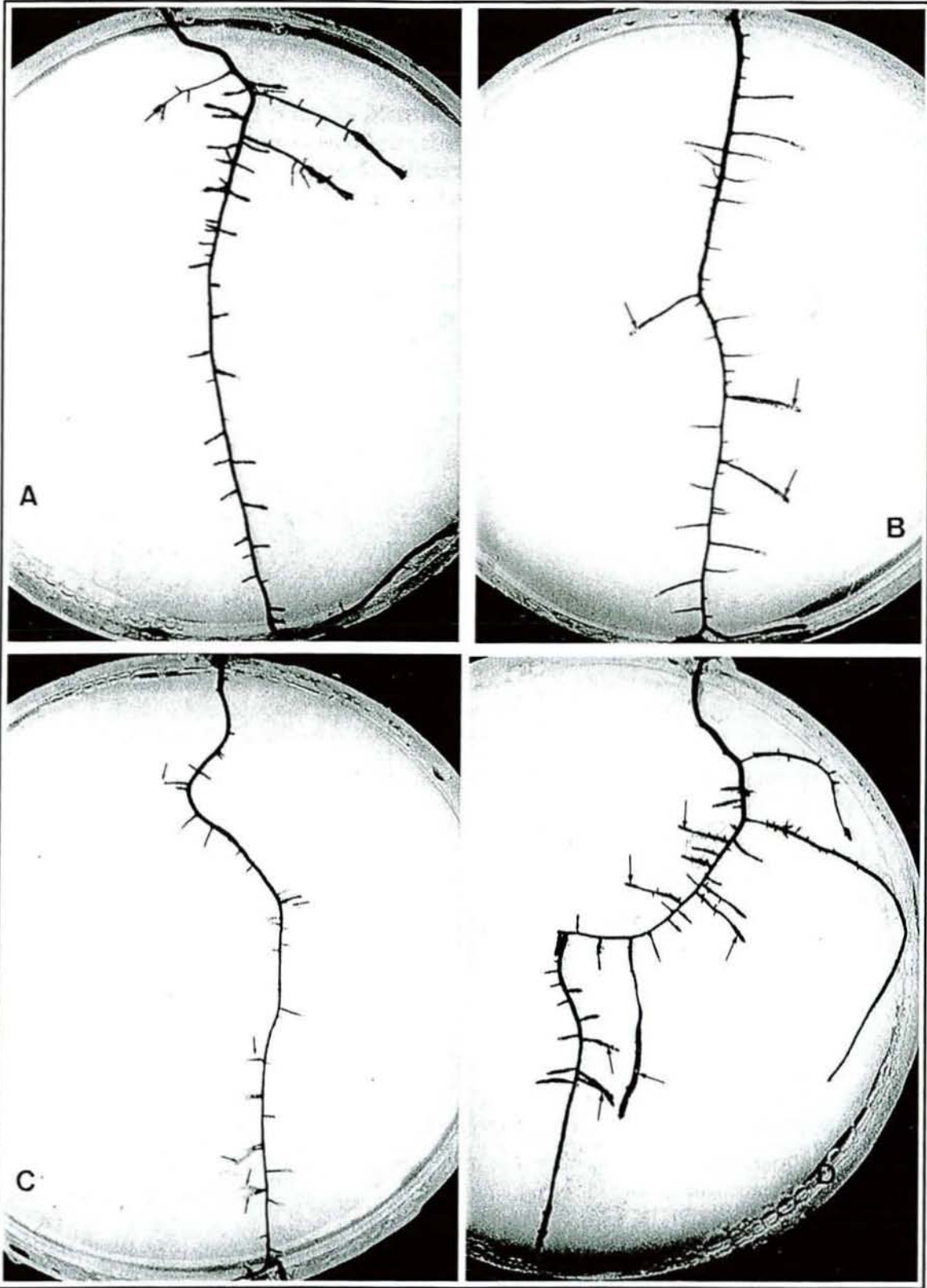


Fig. 5. — Root systems of Norway spruce seedlings inoculated with *Morchella esculenta* and eventually with *Bacillus circulans* and *Acinetobacter johnsonii*. a, single inoculation with a monosporal morel strain; b, dual inoculation with a monosporal fungal strain and with the bacteria; c, single inoculation with a heterokaryotic morel strain; d, dual inoculation with a heterokaryotic morel strain and with the bacteria (small arrows, mycorrhiza-like modified short roots with limited growth potential; large arrows, club-shap modified rootlets with prolonged growth potential).

Additional experiments were also performed to assess the specificity of different morels to plant species. Surface sterilised seeds of *Pinus banksiana* Lamb. and *Betula pendula* Roth. were germinated and precultivated on peat during 5-6 weeks in a growth chamber (photoperiod, 16/8 h; light intensity, 80 mmol m⁻² s⁻¹; temperature, 24°C). They were inoculated with a mix of *Morchella esculenta* and *Morchella elata* and grown for 8-10 weeks. In comparison with control plants, the inoculated birches exhibited reduced shoot but a similar root development (data not shown). In contrast, in pine assays, the effects of the inoculation were higher, as both shoot and root development were reduced (fig. 6).

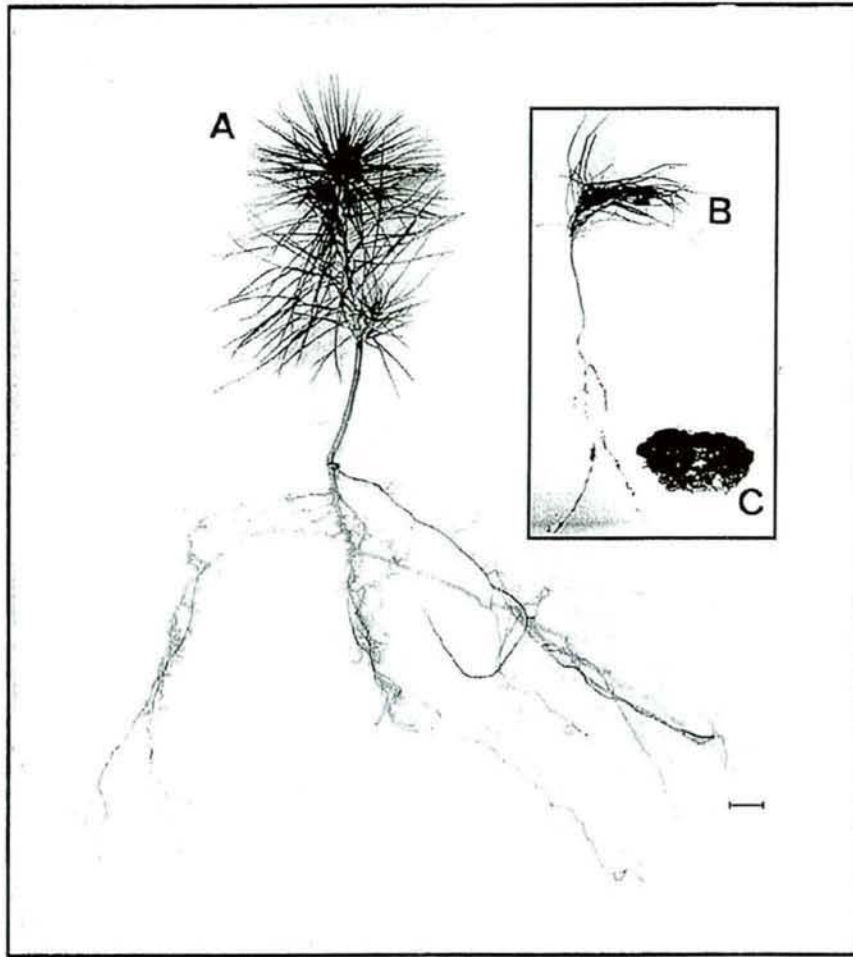


Fig. 6. — Confrontation assay between *Pinus banksiana* and a *Morchella esculenta* + *M. elata* mix. A, control plant; B, inoculated plant; C, sclerotia formed close to B roots. Scale bar represents 1 cm.

The kind of the interaction with the roots was also different according to the plant partner. Dense mycelial masses formed around root sectors of the birch trees (fig. 7), whereas large sclerotia formed close to, but not in direct contact with, the pine roots (fig. 6). With either of the plant species, a direct penetration of root tissues by the fungus could not be detected, but the remarkable number of dead plants at the end of the assays suggests a kind of necrotrophic parasitism of the fungus. Using PCR techniques described in the following section, it was possible to demonstrate that from the mixed inoculates, only *M. esculenta* developed in presence of birches, and respectively that only *M. elata* grew in

presence of the pines (fig. 8). In additional control assays without plants, the mixed inoculum displayed a very reduced growth in the peat substrate used for the assays. Thus, this second series of experiments demonstrates clearly that morel species need a compatible plant partner to colonise certain kinds of substrates.

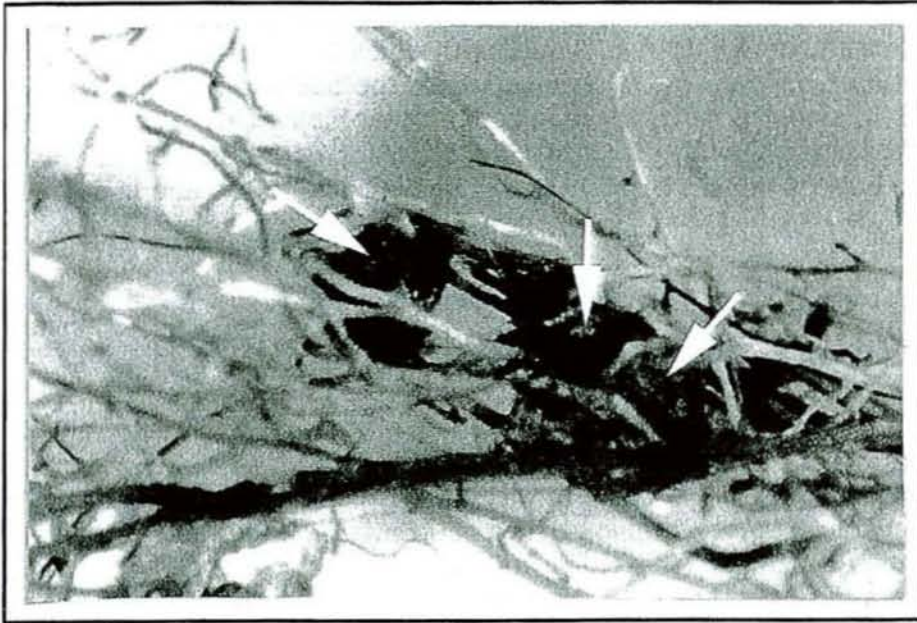


Fig. 7. — Detailed view of birch roots with dense mycelial masses formed by *Morchella elata* (white arrows).

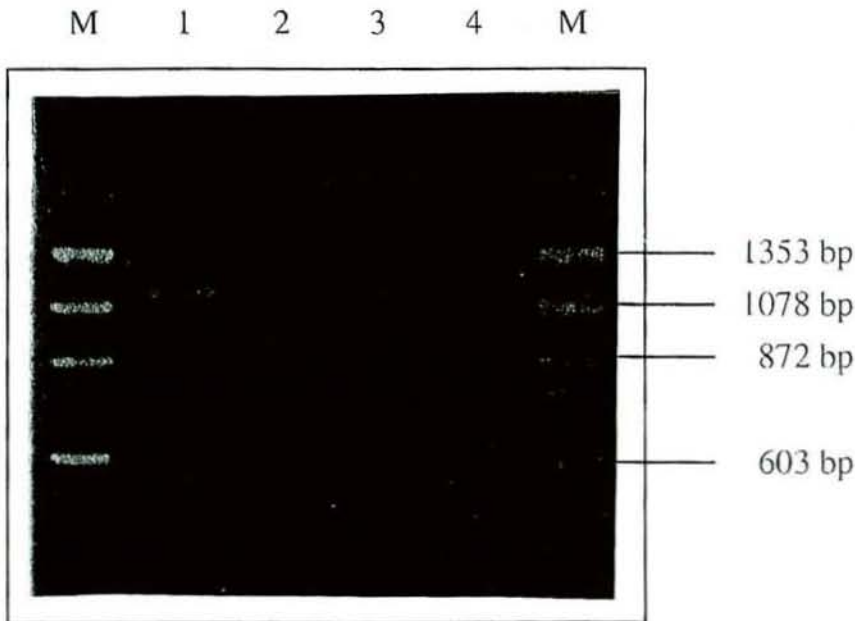


Fig. 8. — Agarose electrophoresis gel of the rDNA spacer ITS of *Morchella esculenta* (1), *M. elata* (2), the mycelial masses formed around root sectors of the birches (3) and of the large sclerotia formed close to *Pinus banksiana* roots (4). M = fragment size markers [X 174 digested by Hae III].

In summary, the above experimental investigations firstly reinforce the hypotheses emitted by Buscot (1992a and 1993), that associations of morels with plants are crucial in the perennial ecological strategy observed in stable ecosystems and that heterokaryosis is an advantage for the fungus in this situation. Secondly, the experiments implied that not only the associations but also their nature could be specific and depend on the taxa of both partners. *M. esculenta* formed a different kind of association with the Norway spruce than with the birch and none with *P. banksiana* with which *M. elata* in turn formed a third kind of association. However, the experiments with the bacteria also demonstrate that the features of the associations can be modified by other biological factors. This suggests that using the associations with plants as a criterion for determination and as an element helping to clear the morel systematics must be done cautiously and in combination with further criteria.

LINK WITH THE SYSTEMATICS

In recent years the potential of modern biological methods to improve the morel systematics was assessed by several authors.

The isozyme polymorphism was used by Gessner *et al.* (1987) and Yoon *et al.* (1990) to characterise geographic isolates of *Morchella esculenta* from North America. Kulkarni and Kamerath (1989), Royse and May (1990) also compared different American *Morchella* species by this method. Finally, Wipf *et al.* (1996a) assessed whether isozyme polymorphism in different members of the *Morchellaceae* could be used to clarify the systematics of the family. The analysis by the different authors allowed fine discriminations at the inter — or intraspecific levels and appeared useful in strain characterization. However, Wipf *et al.* (1996a) underlined that the exhibited polymorphism is not adequate to perform phylogenetic analysis or to clear the species concept.

The large subunit of the rDNA of *Morchellaceae* was also analysed with PCR/RFLP by Bunyard *et al.* (1994). However, the authors reported higher degrees of polymorphism between intraspecific populations than among putative species in certain cases, which illustrates further the difficulty to define species in morels. In a more recent paper, Buscot *et al.* (1996) showed that polymorphism of the internal transcribed (ITS) spacer of ribosomal DNA is more adequate to clarify morel systematics. The analysis allowed to differentiate clearly all genera in the *Morchellaceae* and confirmed both species groups recognised in all classifications, i.e. black (*sectio distantes*) (Jacquetant, 1984; Weber, 1995) and yellow morels (*sectio adnatae*), which exhibited respective ITS lengths of 740-750 and 1150-1220 bp, respectively (fig 9). Sequence analysis of the ITS region confirmed this high genetical distance between black and yellow morels (Wipf *et al.* 1996b), further suggesting that they should perhaps be considered as distinct genera, as *Mitrophora* is. Within each “genera”, slight length variations and different restriction profiles of the ITS region allowed to separate several species (fig. 9).

At present, the performed molecular biological analysis reinforce the validity of taxa like the yellow morels *M. spongiosa* var *dunensis* and *M. hortensis* which do not exhibit remarkable typological criteria but are well characterisable by their specific ecology. In contrast, the distinction between *M. esculenta* and *M. vulgaris* proposed by Clowez (1992), on the basis of ecological features is not confirmed by the molecular biological analysis (data not shown).

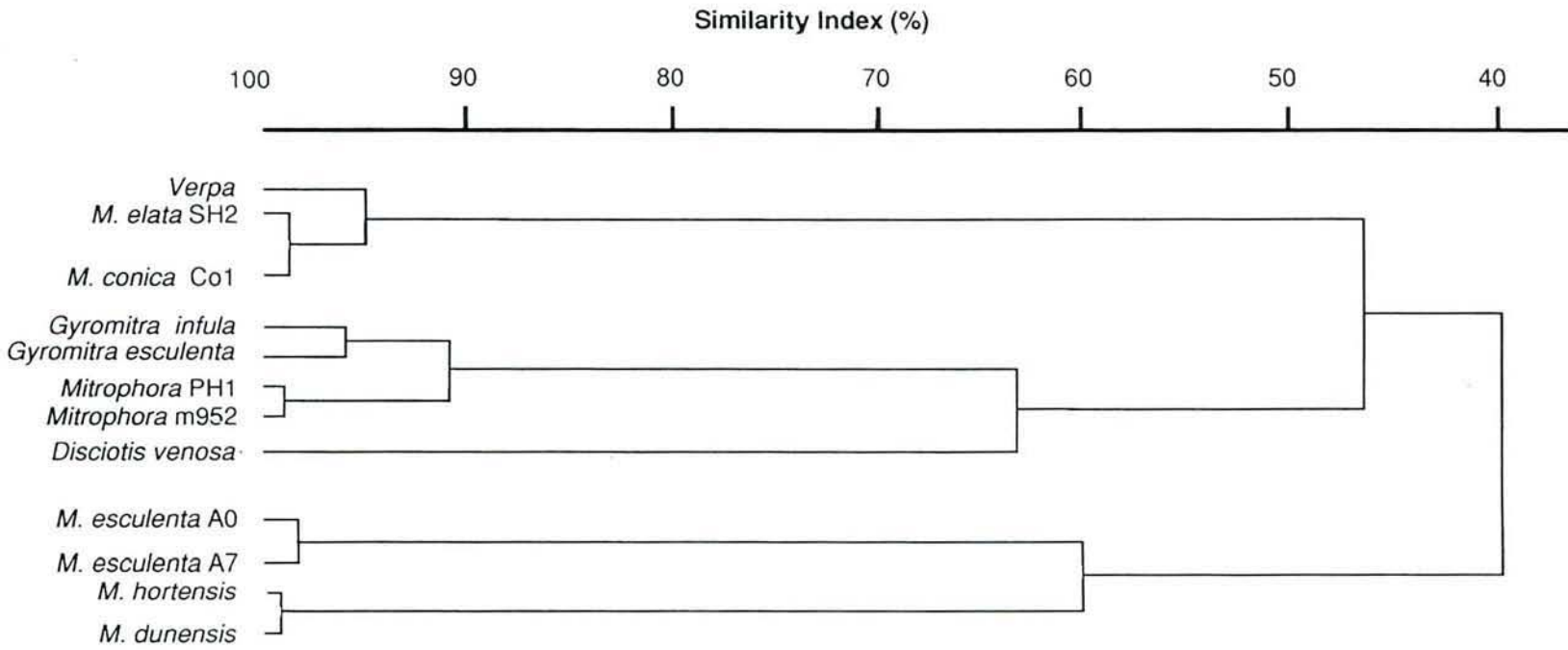


Fig. 9. — Similarity relationships of some *Morchellaceae*. UPGMA tree (Sneath and Sokal, 1973) constructed with the computer program WinCam 2.0 (PC).

Plants	References
<i>Equisetaceae</i> <i>Equisetum hiemale</i>	Buscot & Roux, 1987
<i>Polypodiaceae</i> (species not given)	Lakhanpal <i>et al.</i> , 1990
<i>Pinaceae</i> <i>Abies alba</i> , <i>Pinus banksiana</i> , <i>Picea abies</i>	Jacquetant, 1984; Duchesne & Weber, 1993; Buscot & Roux, 1987; Clowez & Wipf, 1997
<i>Magnoliaceae</i> <i>Magnolia</i> sp.	Clowez & Wipf, 1997
<i>Fagaceae</i> <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Quercus</i> sp.	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux 1987
<i>Betulaceae</i> <i>Betula</i> sp., <i>Carpinus betulus</i> , <i>Alnus</i> sp.	Jacquetant, 1984
<i>Corylaceae</i> <i>Corylus avellana</i>	Jacquetant, 1984, Buscot & Roux, 1987
<i>Ulmaceae</i> <i>Ulmus miror</i> , <i>Celtis australis</i>	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux, 1987; Clowez & Wipf, 1997
<i>Rosaceae</i> <i>Prunus avium</i> ; <i>Prunus spinosa</i> ; <i>Crataegus monogyna</i> , <i>Rubus fruticosus</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Pyrus communis</i>	Clowez and Wipf, 1997; Buscot & Roux, 1987; Philippoussis & Balis, 1995; Jacquetant, 1984
<i>Fabaceae</i> <i>Robinia pseudioaccacia</i>	Philippoussis & Balis, 1995
<i>Aceraceae</i> <i>Acer pseudoplatanus</i>	Clowez & Wipf, 1997
<i>Cornaceae</i> <i>Cornus sanguinea</i>	Buscot & Roux, 1987
<i>Apiales</i> <i>Hedera helix</i>	Clowez & Wipf, 1997
<i>Vitaceae</i> <i>Vitis vinifera</i>	Condamy & Cornu, 1878
<i>Salilicaceae</i> <i>Populus nigra</i>	Jacquetant, 1984; Clowez and Wipf, 1997
<i>Oleaceae</i> <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Ligustrum vulgare</i> , <i>Olea europaea</i> , <i>Syringa vulgaris</i>	Robert, 1865; Jacquetant, 1984; Buscot & Roux; Clowez & Wipf, 1997
<i>Asteraceae</i> <i>Cynara scolymus</i> , <i>Helianthus tuberosus</i> , <i>Hieracium murorum</i> , <i>Taraxacum</i> sp.	Jacquetant, 1984; Buscot & Roux, 1987
<i>Liliaceae</i> <i>Allium ursinum</i>	Buscot & Roux, 1987
<i>Buddlejaceae</i> <i>Buddleja</i>	Clowez & Wipf, 1997

Table 1 — Listing of plant species near which occurrence of morels have been reported.

Morel species	Associated plants	Observations	Références
<i>M. esculenta</i>	<i>Vitis vinefera</i>	Parasitism	Condamy & Cornu, 1878
<i>M. esculenta</i>	<i>Oleaceae; Cornaceae</i>	Parasitism	Robert, 1865; Buscot & Roux, 1987
<i>M. esculenta</i>	<i>Helianthus tuberosus</i>	Parasitism	Roze, 1883
<i>M. spongiosa</i>	<i>Poacea</i>	Parasitism	Romagnesi, 1963
<i>M. semilibera</i>	<i>Ulmus minor</i>	Ectomycorrhizas	Matruchot, 1909
<i>M. esculenta</i>	<i>Picea abies</i>	Ectomycorrhizas	Buscot & Kottke, 1990
<i>M. elata</i>	<i>Picea abies</i>	Ectomycorrhizas	Buscot, 1994

Table 2 — Association between morels and plant roots in nature which have been analysed precisely.

It appears that a sequence analysis of the ITS region of representative taxa will allow to clear the species concept and possibly the phylogeny of the *Morchellaceae*. Furthermore, it will give indications on which of the ecological features really characterise species and respectively on which of them only reflect the high ecological plasticity of morels.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the "Deutsche Forschungsgemeinschaft" (DFG-Project -Mykorrhiza und Pflanzenmorphogenetik—, Mu 831/2-3) and to the French German Cooperation Program PROCOPE for their financial support. Dr. M. M. Kytöviita kindly revised the language.

REFERENCES

- BUNYARD B.A., NICHOLSON M.S. & ROYSE D.J., 1994 — A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86: 762-772.
- BUSCOT F., 1989 — Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature. *Canadian journal of Botany* 67: 589-593.
- BUSCOT F. & KOTTKE I., 1990 — The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L) Karst. *New phytologist* 116: 425-430.
- BUSCOT F. & BERNILLON J., 1991 — Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycological research* 95: 752-754.

- BUSCOT F., 1992a — Stratégies écologiques et biologiques des Morilles. *Cryptogamie, Mycologie* 13: 171-179.
- BUSCOT F., 1992b — Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *Journal of Plant Physiology* 141: 12-17.
- BUSCOT F., 1993 — Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycological Research*. 97: 136-140.
- BUSCOT F., 1994 — Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst. *Mycorrhiza* 4: 223-232.
- BUSCOT F., WIPF D., DI BATTISTA C., MUNCH J.C., BOTTON B. & MARTIN F., 1996 — DNA polymorphism in morels I: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* 100: 63-71.
- CARPENTER S.E., TRAPPE J.M. & AMMIRATI J.R., 1987 — Observations of fungal succession in the Mont-St Helens devastation zone 1980-1983. *Canadian Journal of Botany* 65: 716-728.
- CHADEFAUD M., 1960 — *Traité de botanique*, Tome I, Masson Eds, Paris, 1118 p.
- CLOWEZ P., 1992 — Mycorrhize entre *Fraxinus excelsior* et *Morchella vulgaris* "signe bioindicateur de site archéologique". *Bulletin de la Société Linnéenne Nord Picardie* 10: 43-46.
- CLOWEZ P. & WIPF D., 1997 — (submitted). Les morilles de stratégie pérenne et colonisatrice: relations avec certaines essences d'arbres et plantes mellifères d'apparition spontanées en France. *Documents Mycologiques*, M. Bon Eds.
- CONDAMY & CORNU M., 1878 — Communication puis notes sur quelques champignons printaniers (*Morchella*, *Gyromitra*, *Verpa*). *Bulletin de la Société Botanique de France* 25: 128-131.
- DUCHESNE L.C. & WEBER M.G., 1993 — High incidence of the Edible Morel *Morchella conica* in a Jack Pine, *Pinus banksiana*, forest following prescribed burning. *Canadian Field — Naturalist*, 107, 1 (Jan-Mar 1993): 114-116.
- GESSNER R.V., 1995 — Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. *Canadian Journal of Botany* 73 (Suppl. 1): 967-972
- GESSNER R.V., Romano M. A. & Schultz R. W., 1987 — Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia* 79: 683-687.
- HERVEY A., BISTIG G. & LEONG I., 1978 — Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269-1274.
- JACQUETANT E., 1984. *Les Morilles*. Plantanida Eds, Lausanne, 112 p.
- KAUL T.N., 1975 — Studies on genus *Morchella* in Jamma and Kashmir, 1) Soil composition in relation to carpophore development. *Bulletin de la société Botanique de Bengal* 29: 127-134.
- KORF R.P., 1973 — *Discomycetes and Tuberales*. In G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman (ed.), *The Fungi* Vol.4, Academic Press, New York-London. pp. 249-319.
- KULKARNI R. & KAMERATH G.D., 1989 — Isozyme analysis of *Morchella* species. *Mushroom Science* 12: 451-457.
- MATRUCHOT L., 1909. *La culture des champignons comestibles* : 418-659.
- MAYR R., 1982 — *Untersuchungen zum wachstum und zur Entwicklung einiger Arten der Mykorrhiza bildenden Gattung Morchella*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Universität Giessen: 135p.
- MOLLIARD M., 1905 — Production expérimentale de l'appareil ascospore de la Morille. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Scéances de l'Académie Sciences* 140: 1146-1148.
- OWER R., 1982 — Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74: 142-144.
- OWER R., MILLS G.L. & MALACHOWSKI J.A., 1986 — Cultivation of *Morchella*. *U.S. Patent*, nb 4,594,809.
- PADEN J.W., 1972 — Imperfect states and the taxonomy of the Pezizales. *Persoonia* 6: 405-414.
- ROBERT E., 1865 — Relations entre la famille des oleinées et les morilles. *Bulletin de la Société Botanique de France* 12: 244-246.
- ROMAGNESI H., 1963 — *Petit atlas des champignons*. Bordas Eds., Paris.

- ROYSE D.J. & MAY B., 1990 — Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. *Biochemical Systematics and Ecology* 18: 475-479.
- ROZE M.E., 1883 — Le parasitisme de *Morchella esculenta* Pers. sur *Helianthus tuberosus* L. *Bulletin de la Société Botanique de France* 30: 139-143.
- SNEATH P.H.A. & SOKAL R.R., 1973 — *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Co. San Francisco, California, 573 pp.
- TURNAU K., 1984 — Post-fire cup-fungi of Turbacz and Stare Wiechy montains in the Gorge Range (Polish Western Carpathians). *Prace Botaniczne* 12: 145-170.
- TURNAU K., 1987 — An emergence of *Morchella semilibera* D.C. Fr. after application of gesaprim 50. *Prace Botaniczne* 15: 153-157.
- VOLK T.J. & LEONARD T.J., 1989 — Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoascosporeous strains of *Morchella*. *Mycologia* 81: 523-531.
- VOLK T.J. & LEONARD T.J., 1990 — Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94: 399-406.
- WEBER N.S., 1995 — *A morel's hunter companion*. Lansing, MI: Two Peninsula Press, 209 p.
- WIPF D., BEDELL J.P., MUNCH J.C., BOTTON B. & BUSCOT F., 1996a — Polymorphism in Morels: Isozyme Electrophoretic Analysis. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 819-827.
- WIPF D., MUNCH J.C., BOTTON B. & BUSCOT F., 1996b — DNA polymorphism in morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3541-3543.
- YOON C.S., GESSNER R.V. and ROMANO M.A., 1990 — Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia* 82: 227-235.

Conclusion générale et perspectives



Dans ses objectifs, le présent travail procédait d'une double démarche:

- Développer un outil moderne capable de résoudre les nombreuses ambiguïtés de la systématique et de la biologie du genre *Morchella*.
- Contribuer par des observations de terrains et des expérimentations à compléter les données parcellaires accumulées depuis plus d'un siècle dans le domaine de l'écologie des morilles.

Parmi les types de polymorphismes moléculaires examinés, **la variabilité isoenzymatique** a permis les distinctions les plus fines. En particulier, seul ce polymorphisme a autorisé la caractérisation des souches hétérocaryotiques. Il s'agit ici d'une avancée, dans la mesure où chez la morille, la formation d'hétérocaryons n'avait été étudiée auparavant que par le biais d'expériences de complémentation fonctionnelle de mutants (Volk et Leonard, 1989), cette méthode lourde ne s'appliquant pas à des souches sauvages. Le polymorphisme isoenzymatique, qui a également permis la mise en évidence d'hétérocaryons chez *Agaricus bitorquis* (Roux et Labarère, 1990), permet donc de caractériser les produits d'interactions somatiques chez les champignons. Cependant, cette méthode ne saurait constituer un aboutissement dans l'étude de l'hétérocaryotie en particulier chez la morille. En effet, outre le fait que les activités enzymatiques exprimées sont variables dans le temps et en fonction de l'état physiologique des souches, ce polymorphisme ne permet pas le suivi précis de populations hétérogènes de noyaux dans des articles hyphaux coenocytiques. Le développement de sondes génomiques homologues de marqueurs moléculaires de l'hétérocaryotie, caractérisés par RAPD, permettra d'atteindre cet objectif.

Par ailleurs, le polymorphisme isoenzymatique révélé dans notre étude ne permet pas la caractérisation de taxons ni de leur relations phylogénétiques au sein des morchellacées. Ce résultat est illustré par le fait que dans deux études d'isoenzymes, *M. esculenta* et *M. deliciosa* aient été considérées successivement comme distinctes (Gessner *et al.*, 1987) puis comme conspécifiques (Yoon *et al.*, 1990).

L'étude **du polymorphisme de l'ADN** s'est basée sur l'amplification dirigée des espaceurs ITS et IGS de l'ADNr ainsi que sur la PCR aléatoire utilisant des amorces complémentaires de séquences SSR. Pour cette dernière méthode, l'amorce (GACA)₄ n'a permis aucune amplification. Le faible nombre et la distance élevée entre les sites homologues de cette amorce chez les champignons (Meyer *et al.*, 1992) peuvent expliquer ce résultat négatif. Au contraire, l'amorce (GTG)₅ a conduit à l'obtention de produits PCR sur toutes les souches et a permis la caractérisation de chaque espèce étudiée. Cependant, la discrimination intraspécifique n'a été possible que dans le cas de deux souches d'origines géographiques très éloignées et les hétérocaryons n'ont pu être distingués. Ce niveau de

discrimination est équivalent à celui observé chez la truffe (Gandeboeuf, 1997). Cette méthode est donc moins sensible chez les ascomycètes supérieurs que chez les levures dont elle permet une caractérisation d'individus (Welsh et Mc Clelland, 1990; Growhurst *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1992; Schönian *et al.*, 1993).

Le fait que la région IGS1 n'ait pu être amplifiée de manière interprétable que dans le cas de *Disciotis venosa* et de *Morchella esculenta* indique que la spécificité des amorces pourrait différer selon les taxons de morchellacées étudiés. Dans une certaine mesure, ce résultat constitue une mise en évidence indirecte d'un fort polymorphisme de l'espaceur IGS1 chez les morilles. Une situation analogue a été décrite au sein du genre *Lactaria*, dont l'espaceur ITS, mieux conservé par essence (Gardes, communication personnelle), présente lui-même un polymorphisme de taille important (Guérin-Laguette, communication personnelle). Cette situation caractérise également le genre *Morchella*, chez lequel la longueur de l'ITS varie entre 740 et 1230 pb, permettant la distinction d'au moins trois groupes d'espèces. En considérant les travaux par ailleurs réalisés sur les régions 18 et 28 S (Bunyard *et al.*, 1994; O'Donnell *et al.*, 1997), c'est donc le polymorphisme de la région ITS qui est le plus adapté à une analyse critique de la systématique des morilles. Ce polymorphisme est important à plus d'un titre. Outre les différences de longueurs évoquées plus haut, il faut citer la difficulté à amplifier et à séquencer ce fragment chez certains taxons. L'origine de cette difficulté peut être double. Il peut s'agir, comme évoqué à propos de l'espaceur IGS, d'un manque de spécificité d'une amorce envers les morilles concernées. Les résultats du séquençage indiquent que l'amorce ITS1 serait alors en cause. Par ailleurs il est également possible que certaines espèces de morilles présentent une plus grande hétérogénéité dans les multiples copies de l'ITS. Une telle variabilité n'a pas été décrite jusqu'à présent chez les champignons, mais elle est connue chez les procaryotes (East *et al.*, 1992) et les drosophiles (Schlotterer *et al.*, 1994).

En dépit de ces difficultés, un séquençage de l'ITS a pu être réalisé sur au moins un représentant de chaque taxon des morchellacées étudiées à l'exclusion de *M. hortensis*. Dans la mesure où les comparaisons de séquences moléculaires sont dépourvues d'ambiguïté du point de vue des états de caractères étudiés (Darlu et Tassy, 1993), une analyse de la phylogénie des morchellacées a pu être entreprise sur la base des séquences obtenues. Les distances phylogénétiques observées entre les groupes d'espèces au sein du genre *Morchella* sont comparables voire supérieures à celles avec les genres voisins (*Verpa*, *Mitrophora*). Ceci suggère que de même que les fausses morilles *Mitrophora* et *Verpa* ont été exclues du genre *Morchella* au siècle dernier (Weber, 1995), il paraîtrait justifié de scinder les vraies morilles en deux voire trois genres. Les distances entre morilles noires et jaunes sont en effet considérables, et, au sein du dernier groupe, l'ensemble regroupant *M. spongiola* var. *dunensis*, *M. crassipes* et vraisemblablement *M. hortensis* est distant de l'ensemble *M. vulgaris*/*M. esculenta*. Si on se réfère aux données morphologiques résumées par Weber (1995) et aux observations cytologiques de Berthet (1964) qui considèrent les morilles

jaunes comme plus évoluées, l'ITS des morilles apparaît s'être allongé par des insertions multiples au cours de l'évolution. Il convient cependant de rester prudent dans cette interprétation car notre étude montre à l'évidence une évolution polyphylétique des morchellacées.

L'analyse de la région ITS permet également de discuter la valeur de certaines espèces de morille. Si les morilles noires présentent une longueur d'ITS constante et constituent à ce titre un ensemble homogène, l'analyse des homologies de bases indique que *M. conica* qui possède une morphologie bien typée est une espèce à part entière. Par contre *M. elata* et *M. angusticeps* appartiennent manifestement à une même espèce. C'est donc ici la conception défendue par Heim (1936) et non celle de Boudier (1897) qui serait à retenir. Chez les morilles jaunes, l'ensemble *M. vulgaris/M. esculenta* doit être considéré comme une seule espèce en dépit de sa grande plasticité de forme et d'écologie. En revanche, le concept défendu par Korf (1973) puis Dennis (1978) d'une unique espèce de morilles jaunes est clairement infirmé par notre étude de l'ITS. En effet, *M. spongiola* var. *dunensis*, *M. hortensis* et *M. crassipes* s'avèrent constituer des espèces distinctes. Elles sont à tel point éloignées génétiquement de *M. esculenta* que leur regroupement dans un genre séparé pourrait être envisagé. Il est remarquable que ce groupe qui diffère peu morphologiquement de *M. esculenta*, regroupe des taxons à écologie extrême. La contradiction relevée entre les deux échantillons de *M. crassipes* examinés (Publication 5, Tab. 1) est attribuable à une erreur d'identification dans la collection ATCC. La détermination de *M. crassipes* présente en effet des difficultés puisqu'il existe des formes à pied hypertrophié chez *M. esculenta*. A ce titre, Jacquetant (1984) reconnaît d'ailleurs une variété *crassipes* chez *M. esculenta*.

A l'issue de notre étude du **polymorphisme isoenzymatique et génomique** chez les morchellacées, il convient de souligner à nouveau le parallélisme observé avec les résultats d'études analogues sur les truffes (Henrion, 1993; Gandeboeuf, 1997). Les tubéracées et les morchellacées présentent des niveaux de polymorphismes remarquablement similaires.

Par rapport aux objectifs initiaux de ce travail, on peut considérer que le développement d'un outil permettant une discussion critique de la systématique et de la notion d'espèce a abouti, la région ITS étant parfaitement adaptée. Cet outil peut être affiné, en particulier par le développement d'amorces plus spécifiques des morilles. En ce qui concerne la caractérisation des hétérocaryons, le résultat obtenu grâce à l'étude du polymorphisme enzymatique ne constitue qu'une étape. Le développement de sondes ou d'amorces utilisables pour des marquages *in situ* passe par la mise en évidence de régions génomiques hautement polymorphes. Le polymorphisme révélé par la PCR aléatoire avec l'amorce (GTG)₅ est insuffisant à cet effet, comme dans le cas de la truffe (Gandeboeuf, 1997). Ce dernier auteur a pratiqué une étude plus étendue de la PCR aléatoire sur la

truffe, qui montre que cette méthode ne permet pas d'obtenir de marqueurs capables de distinguer des isolats au sein d'une espèce. Il suggère pour cela de combiner les techniques RFLP et PCR aléatoire (technique AFLP, amplified restriction fragment polymorphism). Une approche plus systématique mais aussi plus lourde consisterait en l'étude du polymorphisme de l'ensemble du génome après séparation des chromosomes par électrophorèse en champs pulsés (PFGE). Des protocoles d'extraction enzymatique ménagée ont été développés pour les champignons filamenteux (Shimizu *et al.*, 1993).

La partie écologique du présent travail a été rendu difficile par la succession de trois mauvaises "saisons à morilles" (1994, 1995, 1996). **L'étude sur le terrain des associations avec des plantes supérieures** a donc été limitée par rapport à l'objectif de départ. Néanmoins, les observations sur le frêne ont permis de confirmer la diversité et l'ambiguïté de leur nature. En effet une croissance intracellulaire des hyphes et une ébauche de réseau de Hartig ont été observées sur les mêmes échantillons. Si l'on retient l'hypothèse d'une association ectendomycorhizienne, le spectre d'associations déjà décrites (parasitisme et ectomycorhize) serait donc élargi. L'aptitude à la symbiose et au parasitisme suivant la plante hôte constitue un autre caractère commun avec les truffes comme le montre une étude récente (Plattner et Hall, 1995). L'analyse précise de ces associations en milieu naturel est à poursuivre et pourra être affinée grâce à l'utilisation de l'outil PCR développé dans ce travail, qui peut en particulier permettre l'identification formelle du partenaire fongique comme notre étude expérimentale l'a montré.

Cette **étude en conditions contrôlées** a permis de progresser dans la compréhension de plusieurs aspects des relations rhizofongiques contractées par la morille. Tout d'abord, elle a apporté une confirmation expérimentale de la spécificité de *M. elata* pour *Pinus banksiana*, qui avait été décrite sur le terrain par Duchesne et Weber (1993). La possibilité d'une association *M. esculenta*-*Betula pendula* évoquée par Jacquetant (1984) a en outre été démontrée. L'étude expérimentale a également renforcé l'hypothèse avancée par Buscot (1992a) et Wipf *et al.* (1994) du caractère crucial de l'association à des plantes supérieures dans un contexte écologique difficile comme celui rencontré par la morille dans sa stratégie pérenne en écosystème forestier stable.

La nature des associations obtenues expérimentalement est nettement parasite. Toutefois, ce résultat doit être analysé avec prudence, car il a été obtenu sur un modèle simplifié utilisant de très jeunes plants. Les expériences à venir devront être menées avec des plants plus âgés et dans des conditions plus proches des sites naturels de la morille (par ex., utilisation de sols provenant de placettes à morilles). Il est à noter que les expériences d'associations ne sont réalisables qu'au printemps (résultat non montré dans le texte), ce qui confirme le caractère saisonnier de l'établissement de telles associations postulé par Buscot (1992c) et montre en outre l'implication probable d'un rythme endogène.

Un tel **rythme endogène** avait déjà été démontré pour l'aptitude à la formation de sclérotés en conditions contrôlées (Buscot, 1987) et la germination des spores en milieu naturel (Schmidt, 1983). L'étude en condition contrôlée menée dans le présent travail a confirmé et précisé ce dernier rythme. En l'état actuel des connaissances, il semble donc que nombre des événements qui caractérisent le développement printanier de la morille soient au moins autant dépendants de facteurs climatiques saisonniers que d'un rythme endogène. Il s'agit de l'association à des racines, de la formation de sclérotés et de la germination des spores.

Au terme de ce travail, il apparaît donc que l'interprétation de la grande plasticité observée dans le mode de vie des morilles n'est possible que par l'intégration de données relevant à la fois de la systématique, de l'écologie et de la biologie. Cette situation semble commune aux ascomycètes supérieurs qui constituent un matériel fongique aussi complexe que fascinant.

Références Bibliographiques

—A—

- AGERER, R., 1987-1996. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn Verlag Eduard Dietenberger, Schwäbisch Gmünd.
- AGERER, R., 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In *experiments with mycorrhizas, séries: Methods in Microbiology* vol. 23 (Norris J.R., Read D.J. et Varma A.K.), Academic Press, New York, 26-73.
- AGUSTIAN, A., MOHAMMED, C., GUILLAUMIN, J.J. et BOTTON, B., 1994. Discrimination of some african *Armillaria* species by isozyme electrophoretic analysis. *New Phytol.*, **128**, 135-143.
- AHMADJIAN, V., 1982. The Nature of Lichens. *Natural History*, **91**, 3, 31-36.
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. et LIPMAN, D.J., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.

—B—

- BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLES, G. et GRESSHOFF, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gel. *Ann. Biochem.*, **196**, 80-83.
- BECKER, G., 1953. Observations sur l'écologie des champignons supérieurs. Thèse Faculté des Sciences de Besançon n° 24, 128 pages.
- BERNARD, N., 1909. L'évolution dans la symbiose. *Ann.Sci. Nat. Bot.*, **9**, 1-96.
- BERTHET, P., 1964. Essais biotaxonomique sur les Discomycètes. Thèse d'état, Faculté des Sciences de Lyon, 160 pages.
- BERTHET, P., 1983. A propos d'une récolte automnale de morilles. *Bull.Soc. lynnéenne Lyon*, **52**, 240-241.
- BERTHET, P., LECOCQ, P. et ZANDONELLA, P., 1975. Etude de spores de Discomycètes operculés au microscope électronique à balayage. *Pollen et spores*, **17**, 203-212.
- BOIRON, P.; 1995. Organisation et biologie des champignons. Nathan Université, Paris, 128 pages.

- BOTTON, B. et CHALOT, M., 1991. Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. In Experiments with mycorrhizas, séries: Methods in Microbiology vol. 23 (Norris J.R., Read D.J. et Varma A.K.), Academic Press Eds, New-York, 203-252.
- BOTTON, B. et MSATEF, Y., 1983. Purification and properties of NADP-dependent glutamate deshydrogenase from *Sphaerostilbe repens*. *Plant Physiol.*, **59**, 438-444.
- BOUDIER, E., 1897. Révision analytique des Morilles de France. *B. Soc. Mycol.Fr.*, **13**, 194-217.
- BOUDIER, E., 1907. Histoire et classification des Discomycètes d'Europe. P.Klincksieck Eds., Paris, 221 pages.
- BOULLARD, B., 1968. Les mycorrhizes. Masson, Paris, 131 pages.
- BRESINSKY, A., GLASER, W. et STANGL, J., 1972. Untersuchungen zur Sippenstruktur der Morchellaceen. *Ber. Bayer. Bot. Ges.*, **43**, 127-143.
- BRUN, A., CHALOT, M., MARTIN, F. et BOTTON, B., 1992. Purification and characterization of glutamine synthetase and NADP-glutamate deshydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiol.*, **99**, 938-944.
- BRUNS, T.D., WHITE, T.J. et TAYLOR, J.W., 1991. Fungal molecular systematics. *Ann.Rev. Ecol. and Syst.*, **22**, 525-564.
- BULLER, H.A.R., 1915. The fungus Lore of the Greeks and Romans. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **5**, 21-66.
- BUNEL, F., 1973. contribution à l'étude écologique des Morilles. Mémoire. ENITA-INRA.
- BUNYARD, B.A., NICHOLSON, M.S. et ROYSE, D.J., 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia*, **86**, 762-772.
- BUNYARD, B.A., NICHOLSON, M.S. et ROYSE, D.J., 1995. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa* and *Disciotis* [Pezizales: *Morchellaceae*] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal gene. *Exp. Mycol.*, **19**, 223-233
- BUSCOT, F., 1987. Contribution à l'étude d'une espèce de Morille de la forêt rhénane: *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier; perspectives de domestication. Thèse d'état, Université de Strasbourg, 179 pages.

- BUSCOT, F., 1989. Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.*, **116**, 425-430.
- BUSCOT, F., 1991. Mycorrhizal succession and Morel biology. Abstract of the 3 ESM, 19-23 August 1991, Sheffield.
- BUSCOT, F., 1992a. Stratégies écologiques et biologiques des Morilles. *Cryptog., Mycol.*, **13** (3), 171-179.
- BUSCOT, F., 1992b. Synthesis of two types of association between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *J. Plant Physiol.*, **141**, 12-17.
- BUSCOT, F., 1992c. Mycorrhizal succession and morel biology. In: *Mycorrhizas in Ecosystems*, (D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter and I.J. Alexander Eds). CAB International Wallingford Oxon UK, 220-224.
- BUSCOT, F., 1993. Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.*, **97**, 136-140.
- BUSCOT, F., 1994. Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (Fr.) Boudier with *Picea abies* (L.) Karst. *Mycorrhiza*, **4**, 223-232.
- BUSCOT, F. et ROUX, J., 1987. Association between living roots and ascocarp of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **89**, 249-252.
- BUSCOT, F. et KOTTKE, L., 1990. The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.*, **116**, 425-430.
- BUSCOT, F. et BERNILLON J., 1991. Mycosprins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycol. Res.*, **95**, 752-754.
- BUSCOT, F., WIPF, D., DI BATTISTA, C., MUNCH, J.C., BOTTON, B. et MARTIN F., 1996. DNA polymorphism in morels I: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycol. Res.*, **100**, 63-71.

—C—

- CAILLEUX, R., 1968. Peut on cultiver la morille ? *Revue de Mycologie*, **37**(4), 304-307.
- CARBONE, I. et KOHN, L.M., 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, **85**, 415-427.

- CARPENTER, S.E., TRAPPE, J.M. et AMMIRATI, J.R., 1987. Observations of fungal succession in the Mont-St Helens devastation zone 1980-1983. *Can. J. Bot.*, **65**, 716-728.
- CHADEFAUD, M., 1960. *Traité de botanique*, Tome I, Masson Eds, Paris, 1118 pages.
- CHALOT, M., BATTUT, P.M., BOTTON, B., LE TACON, F. et GARBAYE, J., 1988. Recent advances in physiological and practical aspects of ectomycorrhizal effects on tree development. *Acta Oecol.*, **9**, 333-351.
- CHALOT, M., BRUN, A., KHALID, A., DELL, B., ROHR, R. et BOTTON, B., 1990. Occurrence and distribution of aspartate aminotransferases in Spruce and Beech ectomycorrhizas. *Can. J. Bot.*, **68**, 1756-1762.
- CLAY, K., 1991. Fungal endophytes, grasses and herbivores. In: *Microorganisms, Plants and Herbivores* (Jones, C., Krischnik, V. And Barbosa P. Eds). John Wiley and Sons, NY, 199-226.
- CLOWEZ, P., 1992. Mycorhize entre *Fraxinus excelsior* et *Morchella vulgaris* "signe bioindicateur de site archéologique". *Bull. Soc. Linnéenne Nord Picardie*, **10**, 43-46.
- CLOWEZ, P. et WIPF, D., 1997 (soumis). Les morilles de stratégie pérenne et colonisatrice; relations avec certaines essences d'arbres et plantes mellifères d'apparition spontanées en France. *Documents Mycologiques*, M. Bon Eds.
- CONDAMY et CORNU, M., 1878. Communication puis notes sur quelques champignons printaniers (*Morchella*, *Gyromitra*, *Verpa*). *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **25**, 128-131.
- COOKE, R.C., 1970. Physiology of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* during growth and maturation. *Trans Br. Mycol. Soc.*, **54**, 361-365.
- COOKE, R.C., 1971. Physiological aspects of growth in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Trans Br. Mycol. Soc.*, **56**, 51-59.
- CREGAN, P.B., AKKAYA, M.S., BHAGWAT, A.A., LAVI, U. et RONGWEN, J., 1994. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat (SSR) DNA as Molecular Markers in Plants. In *Plant genome Analysis* (P.M. Gresshoff Eds.), 47-56.
- CURRAH, R.S., HAMBLETON, S. et SMRECIU, A., 1988. *Mycorrhizae* and mycorrhizal fungi of *Calypso bulbosa*. *Amer. J. Bot.*, **75**, 739-752.
- CURRAN, J., DRIVER, F., BALLARD, J.W.O. et MILNER, R.J., 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.*, **98**, 547-552.

—D—

- DARLU, P. et TASSY, P., 1993. Reconstruction phylogénétique: concepts et méthodes. Masson, Paris.
- DAVIS, B.J., 1964. Discelectrophoresis. II: method and application to human serum proteins. *Ann. Acad. Sci. New York*, **12**: 404-427.
- DELMAS, J., 1974. Les morilles caractères, écologie, recherches en cours. INRA - Bordeaux. *P.H.M.N.*, **146**, 21-30
- DENNIS, R.W.G., 1978. British ascomycètes (J. Cramer Ed.). Lehre., 585 pages.
- DENNIS, C. et WEBSTER, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III Hyphal interaction. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **57**, 363-390..
- DUPONNOIS, R. et GARBAYE, J., 1991. Techniques for controlled synthesis of the Dougl fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Ann. Sci. Forest.*, **48**, 641-650.
- DUPRE, C., CHEVALIER, G., PALENZONA, M. et BIOCCA, E., 1993. Caractérisation des mycorhizes de différents *Tuber* par l'étude du polymorphisme enzymatique. *Cryptog. Mycol.*, **4**, 163-170.
- DURAND, R., 1983. Effect of inhibitors of nucleic acid and protein synthesis of light-induced primordial initiation in *Coprinus congregatus*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **81**, 553-558.
- DURAND, R., 1985. Blue-UV-light photoreception in fungi. *Physiol. Vég.*, **23**, 935-943.
- DURRIEU, G., 1993. Ecologie des champignons. Masson, Paris, 207 pages.
- DUSCHENE, L.C. et WEBER, M.G., 1993. High incidence of the Edible Morel *Morchella conica* in a Jack Pine, *Pinus banksania*, Forest following prescribed burning. *Can. Field - Natur.*, **107**, 1 (Jan-Mar 1993), 114-116.

—E—

- EAST, A., ALLAWAY, D. et COLLINS, M., 1992. Analysis of DNA encoding 23S rRNA and 16S-23S rRNA intergenic spacer regions from *Plesiomonas shigelloides*. *FEMS Microbiology Letters*, **95**, 57-62.
- ESTEVE, M.A., 1986. Etude chimiotaxonomique des morchellacées et des Helvellacées. Thèse faculté de Pharmacie de Montpellier, 327 pages.

—F—

- FALCK, R., 1920. Wege zur kultur der Morchelarten. *Pilz Krauter Freund*, **3**, 211-223 et 247-255.
- FITTER, A.H., 1985. Functionnal significance of root morphology and root system architecture. In *Ecological interactions in Soil. Plants, microbes and animals* (edited by A.H. Fitter with D. Arkinson, D.J. Read and M.B. Usher). Special publications series of th British Ecological Society, number 9.
- FOURRE, G., 1985. Pièges et curiosités des champignons. Niort, chez l'auteur, 285 pages.
- FRANCK, A. B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch Bot. Ges.*, **3**, 128-145
- FRANKLAND, J.C., HEDGER, J.N. et SWIFT, M.J., 1982. Decomposer basidiomycetes, their biology and ecology. Cambridge University Press. 355 pages.
- FRIES, E.M., 1832. The physical basis of mycotrophy in *Pinus*, Hatch A.B., *The Black Rock Forest Bull.*, n°6 (1937).

—G—

- GALLAUD, I., 1904. Etudes sur les mycorhizes endotrophes. Thèse, Paris.
- GANDEBOEUF, D., 1997. Caractérisation et identification moléculaire de différentes espèces du genre *Tuber*. Thèse, Université de Clermont-Ferrand, 65 pages.
- GARDES, M., WHITE, T.J., FORTIN, J.A., BRUNS, T.D. et TAYLOR, J.W., 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.*, **69**, 180-190.
- GARRETT, S.D., 1959. Ecological groups of soil fungi, a survey of substrate relationships. *New Phytol.*, **50**, 149-166.
- GESSNER, R.V., 1995. Genetics and systematics of North American populations of *Morchella*. *Can. J. Bot.*, **73** (Suppl. 1), 967-972.
- GESSNER, R.V., ROMANO, M.A. et SCHULTZ, R.W., 1987. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia*, **79**, 683-687.
- GNIADKOWSKI, M., FIETT, J. et BORSUK, P., 1991. Structure and evolution of the 5S rRNA genes and pseudogenes in the Genus *Aspergillus*. *J. Mol.Evol.*, **33**, 175-178.

GREIS, H., 1940. Befruchtungsarten bei Morchella. *Jahr. Wiss.Bot. Tidskr.*, **49**, 245-253.

GROWHURST, R.N., HAWTHORNE, B.T. , RIKKERINK, E.H.A. et TEMPLETON, M.D., 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races 1 and 2 by random amplification of polymorphic DNA. *Curr. Genet.*, **20**, 391-396.

—H—

HARLEY, J.L. et SMITH, S.E., 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic presss, London.

HASELWANDER, K., BOBLETER, O. et READ, D.J., 1990. Degradation of ¹⁴C-labelled lignin and dehydropolymer of coniferyl alcohol by ericoïd and ectomycorrhizal fungi. *Arch. Microbiol.*, **153**, 352-354.

HEIM, R., 1936. La culture des Morilles. *Revue de mycologie*, Suppl. 1, 10-11 et Suppl. 2, 19-25.

HENRION, B., 1993. Caractérisation et identification de champignons ectomycorhiziens par amplification enzymatique (PCR) de l'ADN ribosomal. Application au suivi du basidiomycète *Laccaria bicolor* en pépinière forestière. Thèse d'université, Université de Nancy I.

HENRION, B., CHEVALIER, G. et MARTIN, F., 1994. Typing truffles species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycol. Res.*, **98**, 37-43.

HENRION, B., LE TACON, F. et MARTIN, F., 1992. Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol.*, **122**, 289-298.

HERING, T.F., 1967. Fungal decomposition of oak leaf litter. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **50**, 267-273.

HERVEY, A., BISTIG, G. et LEONG, I., 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia*, **70**, 1269-1274.

HIGGINS, D.G., BLEASBY, A.J. et FUCHS, R., 1992. Improved software for multiple sequence alignment. *Cabios*, **8**, 189-191.

HILLIS, D.M. et MORITZ, C., 1990. Molecular Systematics, Sinauer Eds, Sunderland, MA.

—I—

- INGESTAD, T., 1979. Mineral nutrient requirements of *Pinus silvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiologia plantarum*, **45**, 373-380.
- INNIS, M.A. et GELFAND, D.H., 1990. Optimization of PCRs. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press Eds, San Diego pp 3-12.

—J—

- JACQUETANT, E., 1984. Les Morilles. Plantanida, Lausanne, 112 pages.
- JACQUIOT, C., 1978, Ecologie des champignons forestiers, Gauthier-Villars, Paris, 90 pages.
- JEFFRIES, P., 1995. Biology and ecology of mycoparasitism. *Can. J. Bot.*, **73** (Suppl. 1), 1284-1290.
- JENSEN, M.A. et STRAUS, N., 1993. Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Meth. Appl.*, **3**, 186-194.
- JUNG, S.W., GESSNER R.V., KEUDELL, K.C. et ROMANO M.A., 1993. Systematics of *Morchella esculenta* complex using enzyme-Linked immunosorbent assay. *Mycologia*, **85**, 677-684.

—K—

- KAUL, T.N., 1975. Studies on genus *Morchella* in Jamma and Kashmir, 1) Soil composition in relation to carpophore development. *Bull. Soc. Bot. Bengal*, **29**, 127-134.
- KELLER, G., 1992. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. *New Phytol.*, **120**, 351-358.
- KEMKER, B.J., LEHMANN, P.F., LEE, J.W. et WALSH, T.J., 1991. Distinction of deep versus superficial clinical and nonclinical isolates of *Trichosporon beigeli* by isoenzymes and restriction fragment length polymorphisms of rDNA generated by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 1677-1683.
- KORF, R.P., 1972. Synoptic key of the genera of the *Pezizales*. *Mycologia*, **64**, 937-993.100

KORF, R.P., 1973. Discomycetes and Tuberales pp. 249-319. In G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow and A.S. Sussman (ed.), *The Fungi* Vol.4, Academic Press, New York-London.

KOTTKE, I. et OBERWINKLER, F., 1986. Root-fungus interactions observed on initial stages of mantle formation and Hartig net establishment in mycorrhizas of *Amanita muscatia* on *Picea abies* in pure culture. *Can. J. Bot.*, **64**, 2348-2354.

KULKARNI, R. et KAMERATH, G.D., 1989. Isozyme analysis of *Morchella* species. *Mushroom Science*, **12**, 451-457.

—L—

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

LE TACON, F., 1985. Les mycorhizes une coopération entre plantes et champignons. *La Recherche*, **166**, 624-632.

LECOMTE, H., 1887. Note sur le Mycorrhiza. *Bull. de la Soc. Bot. de France*, **34**, 38-39.13

LINDBERG, G., 1947. On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil-inhabiting hymenomycetes. *Arkiv für Botanik*, **33a**, 1-16.

LUDES, B. et MANGIN, P., 1992. Les empreintes génétiques en médecine légale. Tec & Doc Lavoisier, Paris, 143 pages.

LUFT, J.H., 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. Cytol.*, **9**, 409-414.

—M—

MAGAE, Y., HAGA, K., TANIGUCHI, H et SASAKI, T., 1990. Enzymes of strains of *Pleurotus* species (basidiomycetes) compared by gel electrophoresis. *J.Gen.Appl. Microbiol.*, **36**, 69-80.

MARTIN F., COSTA, G., DELARUELLE, C. et DIEZ, J., 1997. Genomic fingerprint of ectomycorrhizal fungi by Microsatellite-primed PCR..In *Mycorrhiza manual*. (A. Varma, B. Hock eds.), Springer Lab Manual, sous presse.

MATRUHOT, L., 1892. Recherche sur le développement de quelques mucédinées. Thèse, Paris.

- MATRUCHOT, L., 1909. La culture des champignons comestibles. 418-659
- MAYR, R., 1982. Untersuchungen zum wachstum und zur Entwicklung einiger Arten der Mykorrhiza bildenden Gattung *Morchella*. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*, Universität Giessen, 135p.
- MEYER W., LIECKFELDT E., WÖSTEMEYER, J. et BÖRNER, T., 1992. DNA fingerprinting for differentiating aggressivity groups of the rape seed pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Mycol. Res.*, **96**, 651-657.
- MIKOLA, P., 1956. Studies of the decomposition of forest litter by basidiomycetes. *Communic. Inst. Forest. Fenniae*, **48**, 19 pages.
- MILLER, S.L., TORRES, P. et McCLEAN, T., 1994. Persistence of basidiospores and sclerotia of ectomycorrhizal fungi and *Morchella* in soil. *Mycologia*, **86**(1), 89-95.
- MOLLIARD, M., 1904. Forme conidienne et sclérotés de *Morchella esculenta*. *Rev. Gén. De Botanique*, **138**, 516-517.
- MOLLIARD, M., 1905. Production expérimentale de l'appareil ascospore de la Morille. *Compt. Rend. Hebd. Scéances Acad. Sci.*, **140**, 1146-1148.
- MOUKHAMEDOV, R., HU, X., NAZARD, R.N et ROBB, J., 1994. Use of polymerase chain reaction amplified ribosomal intragenic sequences for the diagnosis of *Verticillium tricorpus*. *Phytopathol.*, **84** 256-259.
- MUNZENBERGER, B., 1991. Lösliche und zellwandgebundene Phenole in mycorrhizen und nicht mycorrhizierten Wurzeln der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) und der Erdbeerbaumes (*Arbutus unedo* L.) und ihre Bedeutung in der Pilz-Wurzel-Interaktion. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*, Universität Tübingen, 135p.

—N—

- NEUVEGLISE, C., BRYGOO, Y., VERCAMBRE, B. et RIBA, G., 1994. Comparative analyses of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycol. Res.*, **98**, 322-328.

—O—

- O'DONNELL, K., CIGELNIK, E., WEBER, S.N. et TRAPPE, J.M., 1997. Phylogenetic relationships among ascomycocetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, **89**, 48-65.
- OUDEMANS, P. et COFFEY, M.D., 1991. Isozyme comparison within and among worldwide sources of three morphologically distinct species of Phytophthora. *Mycol.Res.*, **95**, 19-30.
- OWER, R., 1982. Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia*, **74**, 142-144.
- OWER, R., MILLS, G.L. et MALACHOWSKI, J.A., 1986. Cultivation of *Morchella*. U.S. Patent, nb 4, 594, 809.

—P—

- PADEN, J.W., 1972. Imperfect states and the taxonomy of the Pezizales. *Persoonia*, **6**, 405-414.
- PANACCIO, M. et LEW, A., 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1151.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F., CATALAN, J. et BRITTON-DAVIDIAN, J., 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Tec & Doc Lavoisier Eds, Paris, 78-145.
- PEARSON, V. et READ, D.J., 1973. The biology of mycorrhiza in the *Ericaceae*. *New Phytol.*, **72**, 371-379, 1325-1331.
- PETERSEN, P.M., 1985. The ecology of Danish soil inhabiting pezizales with emphasis on edaphic conditions. *Opera Botanica*, **77**, 5-38.
- PETRINI, O., 1986. Taxonomy of endophytic leaf fungi of aerial plants tissues. In *Microbiology of the Phyllosphere*, (Fokkema, N.J. and Van den heuvel, J., Eds). Cambridge University Press, London, 175-187.
- PEYRONEL, B., 1923. fructifications de l'endophyte à arbuscules et à vésicules des mycorhizes endotrophes. *Bull. Soc. Mycol. France*, **39**, 175-187.

PHILIPPOUSIS, A. et BALIS, C., 1995. Studies on the morphogenesis of sclerotia and subterranean mycelial network of ascocarps in *Morchella* species. In *Science and cultivation of Edible Fungi*, (Elliot ed.). Balkema Eds.

PLATTNER, I. et HALL, I.R., 1995. Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycol. Res.*, **99**, 1367-1370. 7

—R—

RAYNER, A.D.M., 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia*, **83**, 48-71.

READ, D.J. 1974. *Pezizella ericae* sp. nov. The perfect state of the the typical mycorrhizal endophyte of *Ericaceae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **65**, 381-383.

ROBERT, E., 1865. Relations entre la famille des oleïnées et les morilles. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **12**, 244-246.

ROMAGNESI, H., 1963. Petit atlas des champignons. Bordas , Paris

ROSENBROCK, P., BUSCOT, F. ET MUNCH, J.C., 1995. Fungal succession and changes in the fungal degradation potential during the initial stage of litter decomposition in a black alder forest (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.). *Eur. J. Soil. Biol.*, **31**, 1-11.

ROSENBROCK, P., MARTENS, R., BUSCOT, F., MUNCH, J:C., 1997. Two step Bioremediation of soils contaminated with chloroaromatics. Proceedings of Second International Symposium from the Working Group „Interactions of Soil Minerals with Organic Components and Microorganisms“ of the International Science Society. Elsevier, Amsterdam (sous presse).

ROUX, P. et LABARERE, J., 1990. Isozyme characterization of dikaryotic strains of the edible basidiomycete *Agaricus bitorquis* (Quel.) Sacc. (Syn. *Agaricus edulis*). *Exp. Mycol.*, **14**, 101-112.

ROYSE, D.J. et MAY, B., 1990. Interspecific allozyme variation among *Morchella* spp. and its interferences for systematics within the genus. *Biochem. Syst. Ecol.*, **18**, 475-479.

ROZE, M.E., 1883. Le parasitisme de *Morchella esculenta* Pers. sur *Helianthus tuberosus* L. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, **30**, 139-143

- SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G., ERLICH H.A. et ARNHEIM N., 1985. Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGURI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. et ERLICH, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, F.E. et MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning. In *A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, New York.
- SCHLOTTERER, C., HAUSER, M., VON HAESLER, A. et TAUTZ, D., 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS region in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, **11**, 513-522.
- SCHMIDT, E.I., 1983. Spore germination of and carbohydrate colonization by *Morchella esculenta* at different soil temperatures. *Mycologia*, **75**, 870-875.
- SCHÖNIAN, G., MEUSEL, O., TIETZ, H-J., MEYER, W., GRÄSER, Y., TAUSCH, I., PRESBER, W. et MITCHELL, T.G., 1993. Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with polymerase chain reaction. *Mycoses*, **36**, 171-179.
- SCHUH, H., 1995. Viele Arten, Wenig Wissen. *Die Zeit*, **48**, 52.
- SEIFERT, K.A., WINGFIELD, B.D. et WINGFIELD, M.J., 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Can. J. Bot.*, **73** (Suppl. 1), 760-767.
- SINCLAIR, W.A., SYLVIA, D.M. et LARSEN, A.O., 1982. Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *For. Sci.*, **28**, 191-201.
- SHIMIZU, S., HIGASHIYMU, R. et MATSUMOTO, T., 1993. Chromosome length polymorphism in *Beauveria bassiana*. *J. Sencult.Sci. Japan*, **62**, 45-49.
- SMITH/WEBER, N., 1988. A morel hunters companion. Twopeninsula Press Eds, Lansing, Michigan.
- SNEATH, P.H.A. et SOKAL, R.R., 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 573 pages.

SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E. et MILLS, P.R., 1993. Coffee berry disease pathogen in Africa: genetic structure and relationship to the group species *Colletotricum gloeosporioides*. *Mycol. Res.*, **97**, 995-1000.

SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R. et BROWN, A.E., 1994. Nucleotide sequence of the rDNA spacer 1 enables identification of isolates of *Colletotricum* as *C. acutatum*. *Mycol. Res.*, **98** 186-188.

STRULLU, D.G., 1989. Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Tec et Doc, Paris, 250 pages.

SWOFFORD, D.L., 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony version 3.1.1 computer program distributed by the illinois Natural history survey: Champaign, IL, U.S.A.

—T—

TRAPPE, J.M., 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **15**, 203-222.

TURNAU, K., 1984. Post-fire cup-fungi of Turbacz and Stare Wiechy montains in the Gorge Range (Polish Western Carpathians). *Prace Botaniczne*, **12**, 145-170.

TURNAU, K., 1987. An emergence of *Morchella semilibera* D.C. Fr. after application of gesaprim 50. *Prace Botaniczne*, **15**, 153-157.

—V—

VIDAL, J., GADAL, P., CAVALIE, G. et CAILLIAU-COMMANAY, L., 1977. NADH and NADPH dependent malate dehydrogenase of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plantarum*, **39**, 190-195.

VOLK, T.J. et LEONARD, T.J., 1989. Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoasporous strains of *Morchella*. *Mycologia*, **81**, 523-531.

VOLK, T.J. et LEONARD, T.J., 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycol. Res.*, **94**(3), 399-406.

—W—

WARCUP, J.H., 1981. The mycorrhizal relationship of australian Orchids. *New Phytol.*, **70**, 41-46.

- WEBER, E. et BRESINSKY, A., 1992. Polyploidy in discomycetes. *Persoonia*, **14**, 553-563.
- WEBER, N.A., 1979. Fungus culturing by ants. *In Insect-Fungus Symbiosis*, L.R. Batra Eds, 77-116.
- WEBER, N.S., 1995. A morel's hunter companion. (2^{ème} Edition) Lansing, MI: Two Peninsula Press, 209 pages.
- WELSH, J. et MC CLELLAND, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 7213-7218.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. et TAYLOR, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, 315-322.
- WILLAM, A., TRZCINSKI, T. et WILLAM-ENGELS, L., 1956. La croissance du mycélium de la Morille. *Mushroom Sci.*, **3**, 283-308.
- WILLET, H.J. et WONG, A.L., 1971. Ontogenic diversity of sclerotia of *Sclerotinia sclerotinium* and related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **57**, 515-524.
- WIPF, D., BUSCOT, F. et BOTTON, B., 1994. La Morille dans l'écosystème forestier. *Bull. Soc. Fr. Ecophysiol.*, **19**, F1-2, 55-60.
- WIPF, D., BEDELL, J.-P., MUNCH, J.C., BOTTON, B. et BUSCOT, F. 1996. Studies on polymorphism in morels: I, Isozyme electrophoretic analysis. *Can. J. Microbiol.*, **42**, 819-827.
- WIPF, D., MUNCH, J.C., BOTTON, B. et BUSCOT, F. 1996. DNA polymorphism in morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of Genes Coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3541-3543.
- WIPF, D., KOSCHINSKY, S., CLOWEZ, P., MUNCH, J.C., BOTTON, B. et BUSCOT, F., 1997. Recent advances in ecology and systematics of morels. *Cryptog. Mycol.*, **19**, (sous presse).

YOON, C.S., GESSNER, R.V. et ROMANO, M.A., 1990. Population genetics and systematics of the *Morchella esculenta* complex. *Mycologia*, **82**, 227-235.

Annexes

Annexe 1: Isolats utilisés

N.B.: Dans la colonne "Référence" les numéros correspondent aux numéros d'enregistrement à la DSM, Exs correspond à des *exsicata* et PC se réfère à des souches appartenant à la collection du laboratoire de Biologie Forestière.

Souche	Légateur	Origine	Référence
<i>Disciotis venosa</i> Her 1	Boyle	Beendorf, Sachsen Anhalt (Allemagne) 1994	10393
<i>Disciotis venosa</i> Noyon	Clowez	Noyon (France)	Exs
<i>Gyromitra esculenta</i> 1	Kost	Rhinau, Alsace (France) 1989	10400
<i>Gyromitra esculenta</i> Her 5	Boyle	Braunschweig, Niedersachsen (Allemagne) 1994	10401
<i>Gyromitra infula</i> m954 (3)	Arnold	Neston, Liverpool (Royaume-Uni) 1992	10408
<i>Gyromitra infula</i> m954 (4)	Arnold	Neston, Liverpool (Royaume-Uni) 1992	10402
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (1) (= Mi 2)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10485
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (3)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10486
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (4)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10487
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (5)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10488
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (6)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	CP
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (7)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10407
<i>Mitrophora semilibera</i> m952 (8)	Arnold	Weimar, Thüringen (Allemagne) 1992	10396
<i>Mitrophora semilibera</i> Mi 1	Kost	Schöntal Aschauen, Baden-Württemberg (Allemagne) 1989	CP
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 1	Wipf	Braunschweig, Niedersachsen (Allemagne) 1995	10397
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 2	Wipf	Braunschweig, Niedersachsen (Allemagne) 1995	10398
<i>Mitrophora semilibera</i> PH 3	Wipf	Braunschweig, Niedersachsen (Allemagne) 1995	10399
<i>Morchella angusticeps</i> fungi perf	Amir	U.S.A.	10461
<i>Morchella angusticeps</i> Penn. State	Amir	Colombie Britannique (Canada) 1975	10462

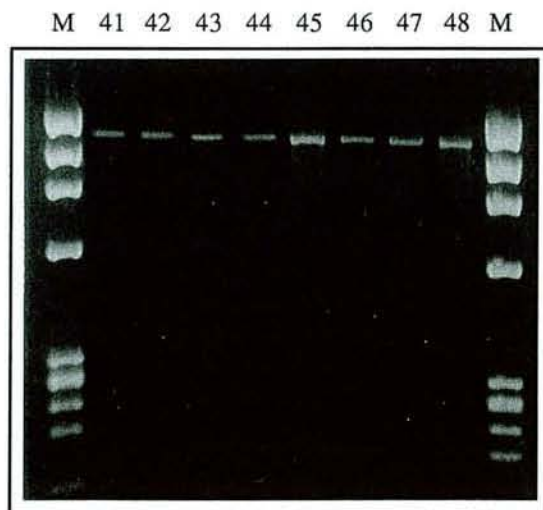
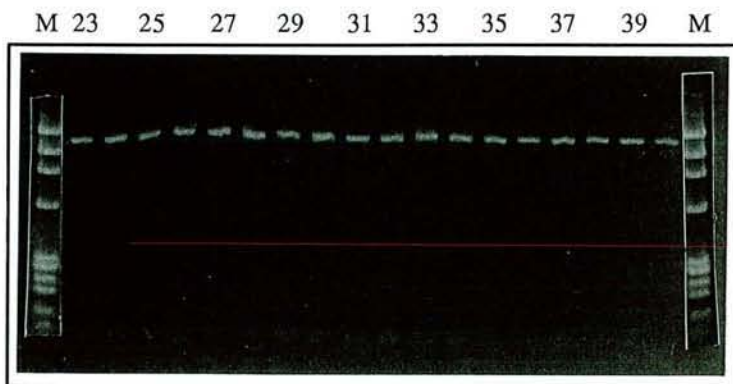
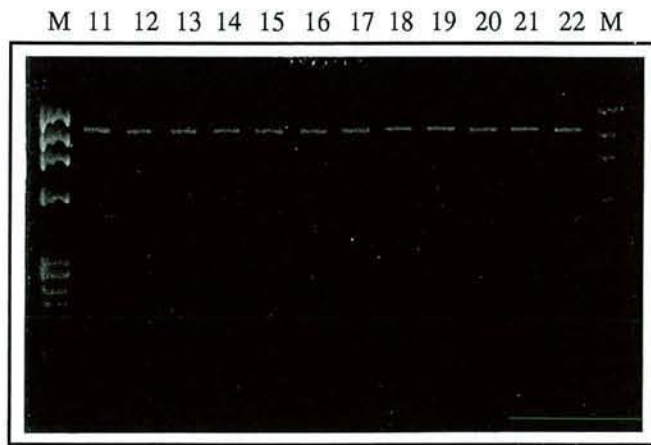
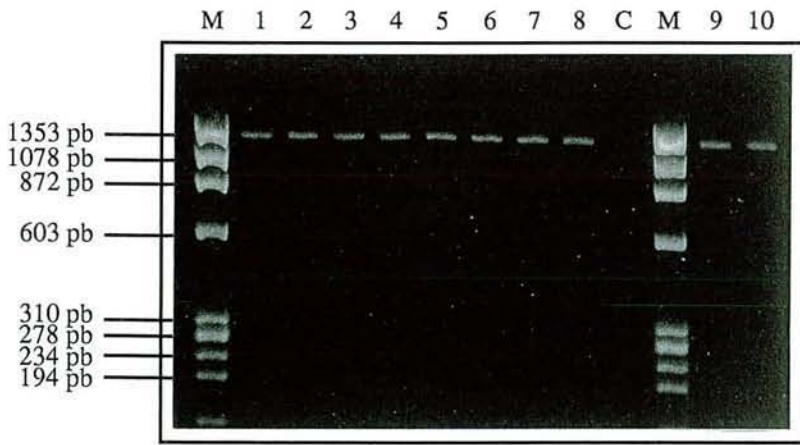
<i>Morchella conica</i> Co 1	Luschka	Graubünden (Suisse) 1995	10464
<i>Morchella conica</i> Co 2	Luschka	Graubünden (Suisse) 1995	10465
<i>Morchella conica</i> Co 3	Luschka	Graubünden (Suisse) 1995	10466
<i>Morchella conica</i> Co 4	Luschka	Graubünden (Suisse) 1995	10467
<i>Morchella conica</i> m889	Arnold	Hannover, Niedersachsen (Allemagne) 1991	10478
<i>Morchella conica</i> MoIs16	Amir	Nord d'Israël (Israël) 1993	10480
<i>Morchella conica</i> MoIs18	Amir	Tel Aviv (Israël) 1993	10481
<i>Morchella conica</i> MoIs5	Amir	Tel Dan (Israël) Sept. 1993	10479
<i>Morchella costata</i> (Pas de Calais)	Buscot	Pas de Calais (France) 1995	Exs
<i>Morchella crassipes</i> ATCC 13277	Amir	U.S.A.	10458
<i>Morchella crassipes</i> Her II	Boyle	Königslutter, Niedersachsen (Allemagne) 1994	10460
<i>Morchella crassipes</i> Her I	Boyle	Königslutter, Niedersachsen (Allemagne) 1994	10459
<i>Morchella elata</i> 1	Luschka	Davos - Wolfgang (Suisse), 1995	10482
<i>Morchella elata</i> Aus 2	Faris	Australie, 1993	CP
<i>Morchella elata</i> Aus1	Faris	Australie, 1993	CP
<i>Morchella elata</i> NZ	Cole	Rangiora, North Canterbury (Nouvelle- Zélande), 1996	CP
<i>Morchella elata</i> SH 2	Philipoussis	Archaia (Grèce)	CP
<i>Morchella elata</i> SH 3	Philipoussis	Archaia (Grèce)	CP
<i>Morchella esculenta</i> (Costa-Rica 1)	Melendez	Costa-Rica	Exs
<i>Morchella esculenta</i> (Costa-Rica 2)	Melendez	Costa-Rica	Exs
<i>Morchella esculenta</i> (Maroc)	Clowez	Maroc	Exs
<i>Morchella esculenta</i> (sous aubépines)	Clowez	France	Exs
<i>Morchella esculenta</i> (sous aulnes)	Clowez	France	Exs
<i>Morchella esculenta</i> (sur charbon de bois)	Clowez	France	Exs
<i>Morchella esculenta</i> OA10	Wipf	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10388

<i>Morchella esculenta</i> 0A11	Wipf	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10389
<i>Morchella esculenta</i> 0A12	Wipf	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10390
<i>Morchella esculenta</i> 0A8	Wipf	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10386
<i>Morchella esculenta</i> 0A9	Wipf	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10387
<i>Morchella esculenta</i> 7A6	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10391
<i>Morchella esculenta</i> 7A7	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10414
<i>Morchella esculenta</i> 7B1	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10415
<i>Morchella esculenta</i> 7B10	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10423
<i>Morchella esculenta</i> 7B12	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10425
<i>Morchella esculenta</i> 7B13	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10426
<i>Morchella esculenta</i> 7B2	Wipf	Offendorf, -Alsace (France) 1987	10416
<i>Morchella esculenta</i> 7B20	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10427
<i>Morchella esculenta</i> 7B24	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10428
<i>Morchella esculenta</i> 7B25	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10429
<i>Morchella esculenta</i> 7B26	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10430
<i>Morchella esculenta</i> 7B3	Wipf	Offendorf, -Alsace (France) 1987	10417
<i>Morchella esculenta</i> 7B4	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10418
<i>Morchella esculenta</i> 7B6	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10419
<i>Morchella esculenta</i> 7B7	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10420
<i>Morchella esculenta</i> 7B8	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10421

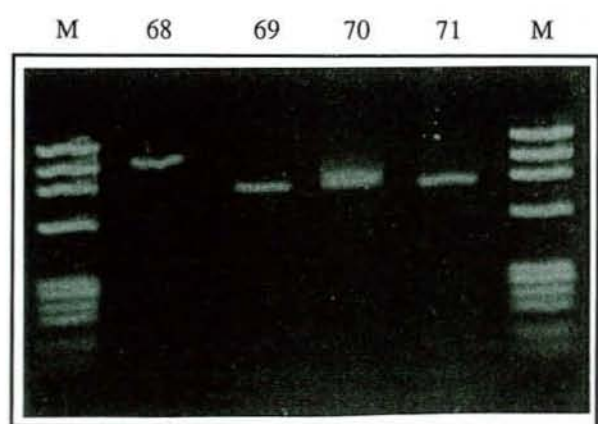
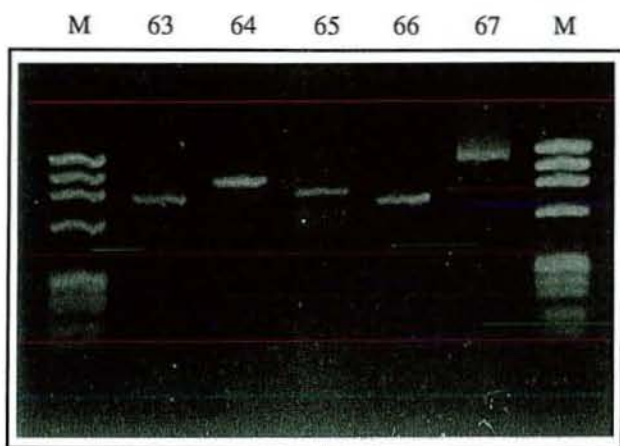
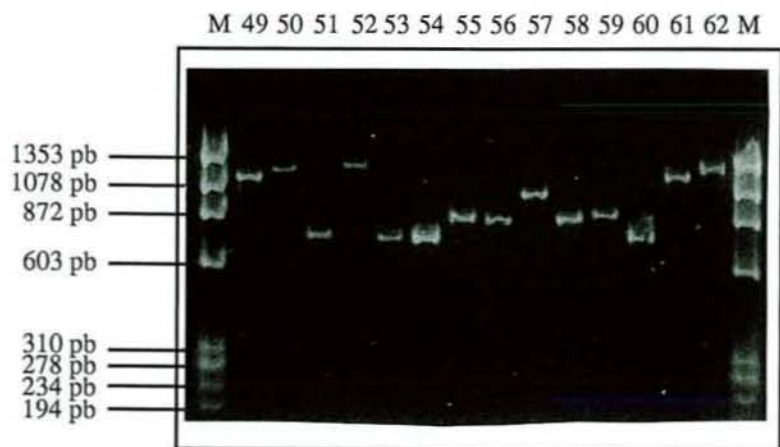
<i>Morchella esculenta</i> 7B9	Wipf	Offendorf, Alsace (France) 1987	10422
<i>Morchella esculenta</i> A0	Kost	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10372
<i>Morchella esculenta</i> A0A7	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10376
<i>Morchella esculenta</i> A0B0	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10377
<i>Morchella esculenta</i> A0B7	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10378
<i>Morchella esculenta</i> A7	Buscot	Offendorf, Alsace (France) 1987	10374
<i>Morchella esculenta</i> A7B7	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10379
<i>Morchella esculenta</i> ATCC 32785	Amir	U.S.A.	10370
<i>Morchella esculenta</i> B0	Kost	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10373
<i>Morchella esculenta</i> B0A7	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10380
<i>Morchella esculenta</i> B0B7	Buscot	Souche Hétérocaryotique	10381
<i>Morchella esculenta</i> B7	Buscot	Offendorf, Alsace (France) 1987	10375
<i>Morchella esculenta</i> C0	Kost	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10432
<i>Morchella esculenta</i> C7	Buscot	Offendorf, Alsace (France) 1987	10431
<i>Morchella esculenta</i> D0	Kost	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10433
<i>Morchella esculenta</i> D7	Buscot	Offendorf, Alsace (France) 1987	10434
<i>Morchella esculenta</i> E0	Kost	Kreuzingen, Weisweil Baden-Württemberg (Allemagne) 1990	10453
<i>Morchella esculenta</i> E7	Nuscot	Offendorf, Alsace (France) 1987	10454
<i>Morchella esculenta</i> m19	Arnold	Leipzig-Mark-Kleeberg, Sachsen (Allemagne) 1955	10371
<i>Morchella esculenta</i> Mo24/2	Buscot	Offendorf, Alsace (France) 1990	10385
<i>Morchella hortensis</i>	Philipoussis	Archaia (Grèce)	
<i>Morchella spomgiola</i> var. <i>dunensis</i> Du 3	Buscot	Merlimont, Pas de Calais (France) 1995	10463
<i>Morchella spomgiola</i> var. <i>dunensis</i> Du 1	Buscot	Merlimont, Pas de Calais (France) 1995	10471

<i>Morchella spongiola</i> var. <i>dunensis</i> (La Tranche sur Mer)	Clowez	La Tranche sur Mer (France) 1995	<i>Exs</i>
<i>Morchella spongiola</i> var. <i>dunensis</i> (Pas de Calais)	Buscot	Pas de Calais (France) 1995	<i>Exs</i>
<i>Morchella spongiola</i> var. <i>dunensis</i> (Quiberon)	Clowez	Quiberon (France)1995	<i>Exs</i>
<i>Morchella spongiola</i> var. <i>dunensis</i> Du 2	Buscot	Merlimont, Pas de Calais (France) 1995	10472
<i>Morchella vulgaris</i> 1	Wipf	Noyon (France) 1995	<i>Exs</i>
<i>Morchella vulgaris</i> 2	Wipf	Noyon (France) 1995	<i>Exs</i>
<i>Morchella vulgaris</i> 3	Wipf	Noyon (France) 1996	<i>Exs</i>
<i>Verpa conica</i> 1	Kost	Schöntal Aschauen, Baden-Württemberg (Allemagne) 1989	10403
<i>Verpa conica</i> 3	Kost	Schöntal Aschauen, Baden-Württemberg (Allemagne) 1989	10392

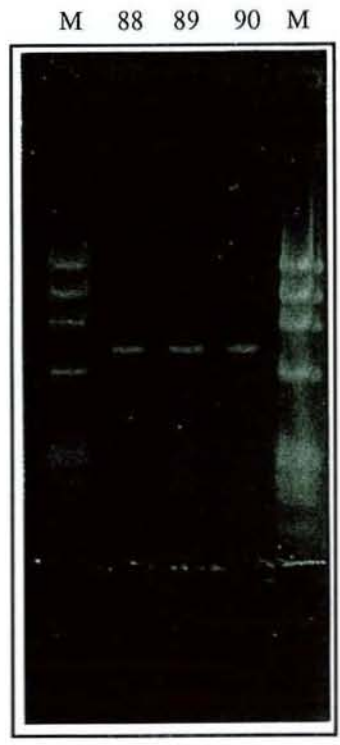
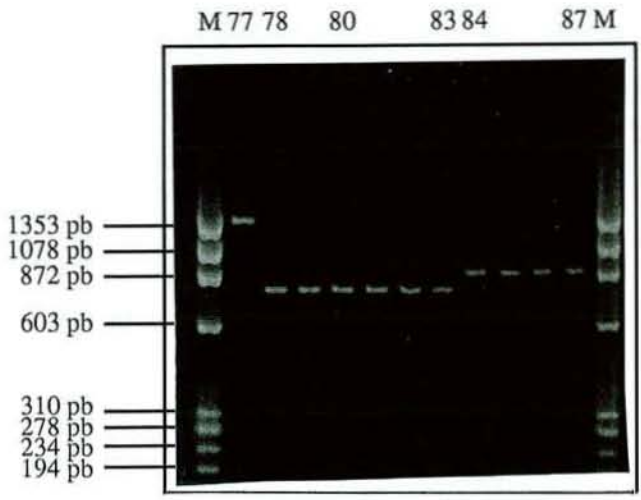
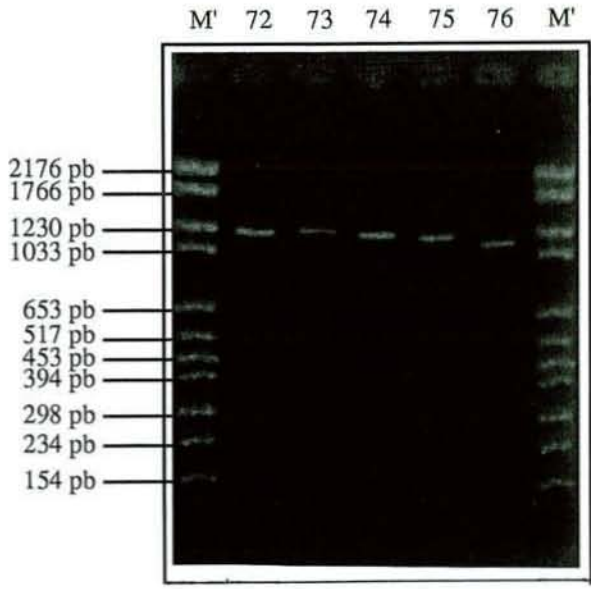
Annexe 2: Gels d'amplification de la région ITS



M	ADN du phage Φ X 174 digéré par <i>Hae</i> III	36	<i>Morchella esculenta</i> Maroc
C	Témoin négatif	37	<i>Morchella vulgaris</i> 1
1	<i>Morchella esculenta</i> m 19	38	<i>Morchella vulgaris</i> 2
2	<i>Morchella esculenta</i> OA10	39	<i>Morchella esculenta</i> C7
3	<i>Morchella esculenta</i> OA11	40	<i>Morchella esculenta</i> 7B8
4	<i>Morchella esculenta</i> OA12	41	<i>Morchella esculenta</i> A0
5	<i>Morchella esculenta</i> 7B1	42	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
6	<i>Morchella esculenta</i> 7B2	43	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
7	<i>Morchella esculenta</i> 7B3	44	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
8	<i>Morchella esculenta</i> OA8	45	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
9	<i>Morchella esculenta</i> OA9	46	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
10	<i>Morchella esculenta</i> 7B7	47	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
11	<i>Morchella esculenta</i> C7	48	<i>Morchella esculenta</i> B7
12	<i>Morchella esculenta</i> 7B9		
13	<i>Morchella esculenta</i> 7A6		
14	<i>Morchella esculenta</i> 7A7		
15	<i>Morchella esculenta</i> 7B13		
16	<i>Morchella esculenta</i> 7B20		
17	<i>Morchella esculenta</i> 7B24		
18	<i>Morchella esculenta</i> 7B25		
19	<i>Morchella esculenta</i> 7B26		
20	<i>Morchella esculenta</i> E7		
21	<i>Morchella esculenta</i> 7B4		
22	<i>Morchella esculenta</i> 7B6		
23	<i>Morchella esculenta</i> A7		
24	<i>Morchella esculenta</i> C0		
25	<i>Morchella esculenta</i> D0		
26	<i>Morchella esculenta</i> D7		
27	<i>Morchella esculenta</i> E0		
28	<i>Morchella esculenta</i> 7B10		
29	<i>Morchella esculenta</i> 7B12		
30	<i>Morchella esculenta</i> A7		
31	<i>Morchella esculenta</i> (sous aulnes)		
32	<i>Morchella esculenta</i> (sous aubépines)		
33	<i>Morchella esculenta</i> (sur charbon de bois)		
34	<i>Morchella esculenta</i> (Costa Rica 1)		
35	<i>Morchella esculenta</i> (Costa Rica 2)		

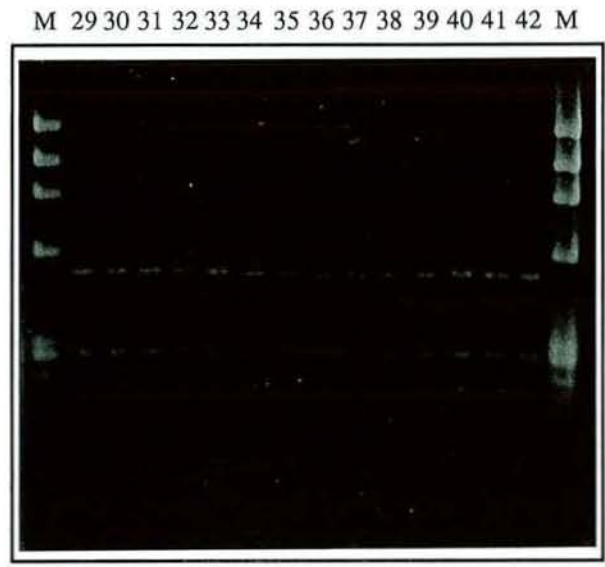
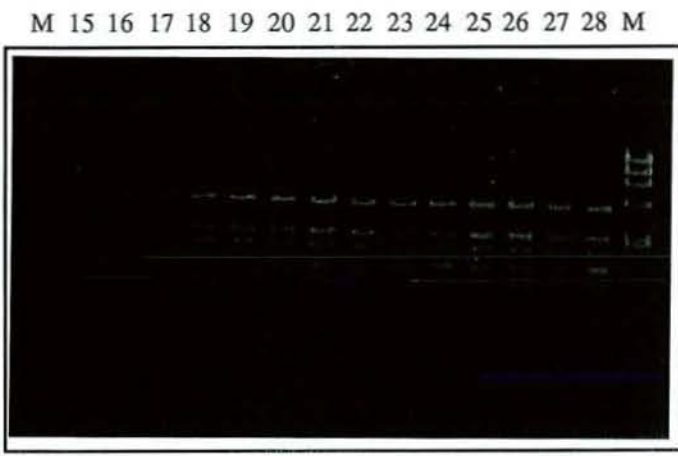
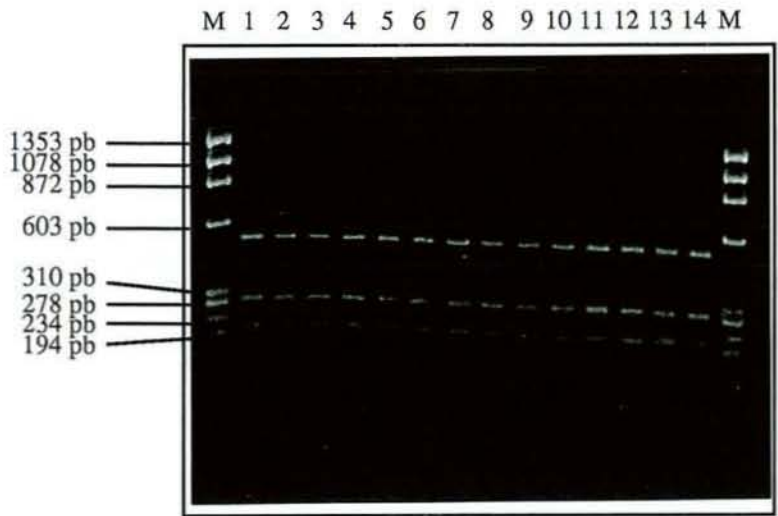


- M ADN du phage Φ X 174 digéré par *Hae* III
49 *Morchella esculenta* A7
50 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 1
51 *Morchella elata* SH2
52 *Morchella hortensis*
53 *Morchella elata* SH3
54 *Morchella conica* Co 1
55 *Gyromitra esculenta* her 5
56 *Mitrophora semilibera* PH 1
57 *Disciotis venosa* Her 1
58 *Mitrophora semilibera* m952(1)
59 *Gyromitra infula* m954(3)
60 *Verpa conica* 3
61 *Morchella esculenta* AO
62 *Morchella crassipes* Her II
63 *Mitrophora semilibera* 952(5)
64 *Disciotis venosa* Noyon
65 *Mitrophora semilibera* 952(4)
66 *Morchella costata* (Pas de calais)
67 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (Pas de calais)
68 *Morchella vulgaris* 3
69 *Gyromitra esculenta* Her 5
70 *Mitrophora semilibera* m952(7)
71 *Mitrophora semilibera* m952(8)

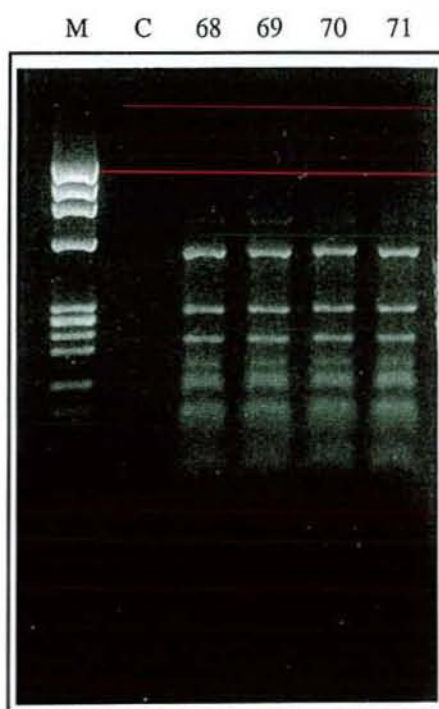
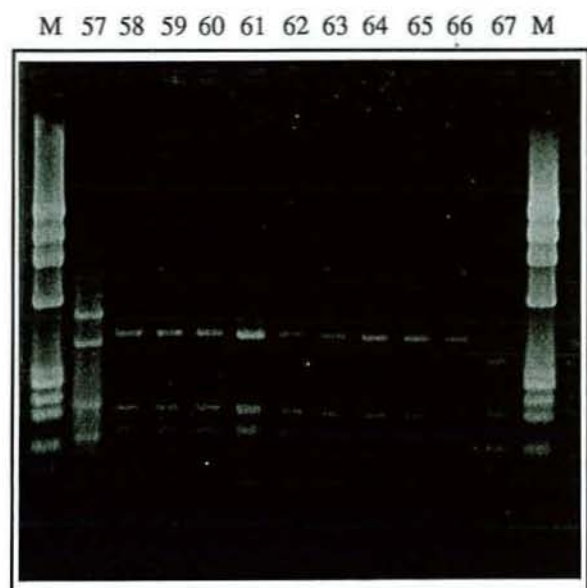
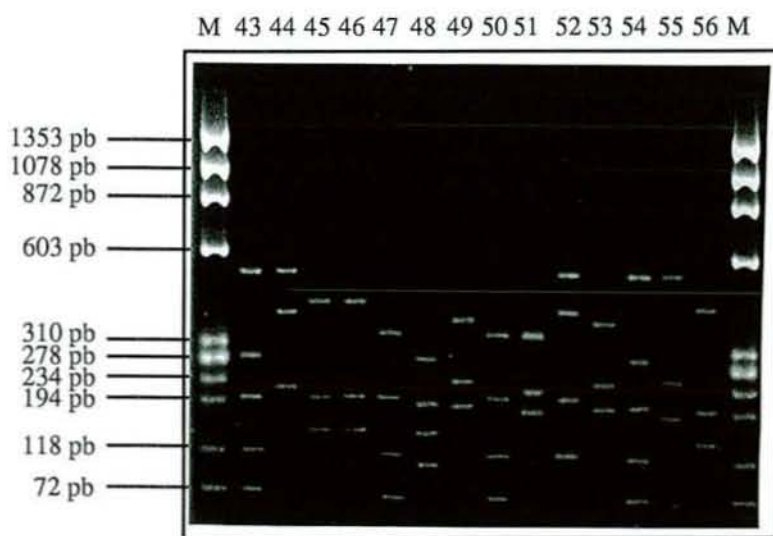


- M ADN du phage Φ X 174 digéré par *Hae* III
M' ADN du phage pBR 328 digéré par *Bgl* I + ADN du phage pBR 328 digéré par *Hinf* I
72 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 2
73 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 3
74 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (Quiberon)
75 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (La Tranche sur Mer)
76 *Morchella esculenta* A7
77 *Morchella crassipes* Her 1
78 *Morchella conica* m 889
79 *Morchella conica* Co 2
80 *Morchella conica* Co 3
81 *Morchella conica* MoIs 5
82 *Morchella elata* 1
83 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*
84 *Mitrophora semilibera* PH 3
85 *Mitrophora semilibera* 952(6)
86 *Mitrophora semilibera* PH 2
87 *Gyromitra infula* 954(4)
88 *Morchella elata* NZ
89 *Morchella elata* Aus1
90 *Morchella elata* Aus2

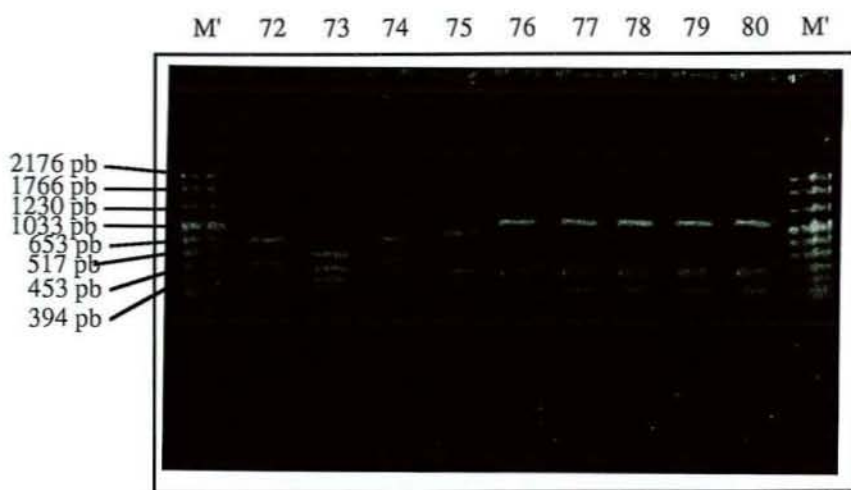
Annexe 3: Gels de digestion de la région ITS



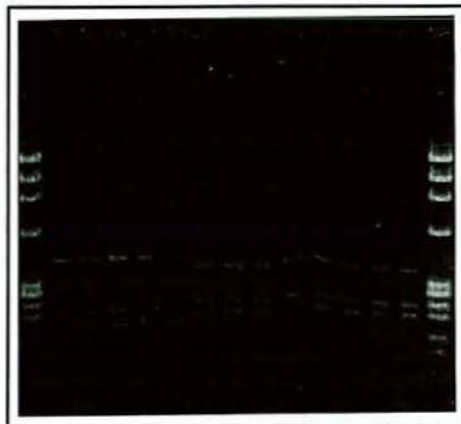
M	ADN du phage Φ X 174 digéré par <i>Hae</i> III	36	<i>Morchella esculenta</i> Maroc
1	<i>Morchella esculenta</i> m 19	37	<i>Morchella vulgaris</i> 1
2	<i>Morchella esculenta</i> OA10	38	<i>Morchella vulgaris</i> 2
3	<i>Morchella esculenta</i> OA11	39	<i>Morchella esculenta</i> C7
4	<i>Morchella esculenta</i> OA12	40	<i>Morchella esculenta</i> 7B8
5	<i>Morchella esculenta</i> 7B1	41	<i>Morchella esculenta</i> A0
6	<i>Morchella esculenta</i> 7B2	42	Masses fongiques sous <i>Betula</i>
7	<i>Morchella esculenta</i> 7B3		
8	<i>Morchella esculenta</i> OA8		
9	<i>Morchella esculenta</i> OA9		
10	<i>Morchella esculenta</i> 7B7		
11	<i>Morchella esculenta</i> C7		
12	<i>Morchella esculenta</i> 7B9		
13	<i>Morchella esculenta</i> 7A6		
14	<i>Morchella esculenta</i> 7A7		
15	<i>Morchella esculenta</i> 7B13		
16	<i>Morchella esculenta</i> 7B20		
17	<i>Morchella esculenta</i> 7B24		
18	<i>Morchella esculenta</i> 7B25		
19	<i>Morchella esculenta</i> 7B26		
20	<i>Morchella esculenta</i> E7		
21	<i>Morchella esculenta</i> 7B4		
22	<i>Morchella esculenta</i> 7B6		
23	<i>Morchella esculenta</i> A7		
24	<i>Morchella esculenta</i> C0		
25	<i>Morchella esculenta</i> D0		
26	<i>Morchella esculenta</i> D7		
27	<i>Morchella esculenta</i> E0		
28	<i>Morchella esculenta</i> 7B10		
29	<i>Morchella esculenta</i> 7B12		
30	<i>Morchella esculenta</i> A7		
31	<i>Morchella esculenta</i> (sous aulnes)		
32	<i>Morchella esculenta</i> (sous aubépines)		
33	<i>Morchella esculenta</i> (sur charbon de bois)		
34	<i>Morchella esculenta</i> (Costa Rica 1)		
35	<i>Morchella esculenta</i> (Costa Rica 2)		



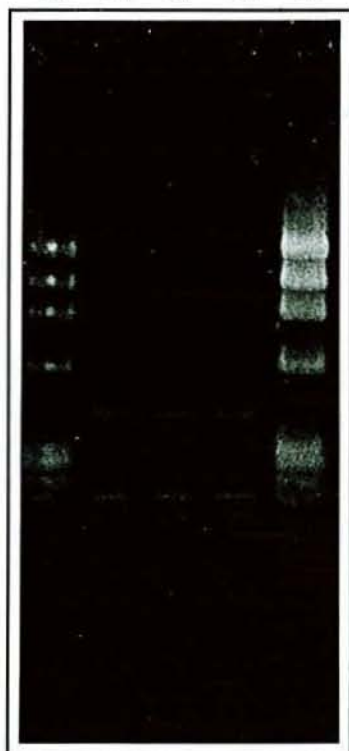
- M ADN du phage Φ X 174 digéré par *Hae* III
C Témoin négatif
43 *Morchella vulgaris* 3
44 *Morchella hortensis*
45 *Morchella elata* SH3
46 *Morchella conica* Co 1
47 *Gyromitra esculenta* Her 5
48 *Disciotis venosa* Her 1
49 *Mitrophora semilibera* m952(1)
50 *Gyromitra infula* m954(3)
51 *Verpa conica* 3
52 *Morchella crassipes* Her II
53 *Mitrophora semilibera* PH 1
54 *Morchella esculenta* AO
55 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 1
56 *Morchella elata* SH2
57 *Morchella crassipes* Her 1
58 *Morchella elata* 1
59 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*
60 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*
61 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*
62 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*
63 *Morchella conica* Co 4
64 *Mitrophora semilibera* 952(5)
65 *Mitrophora semilibera* 952(6)
66 *Mitrophora semilibera* PH 2
67 *Gyromitra infula* 954(4)
68 Masses fongiques sous *Betula*
69 Masses fongiques sous *Betula*
70 Masses fongiques sous *Betula*
71 Masses fongiques sous *Betula*



M81 83 85 87 89 91 93 M

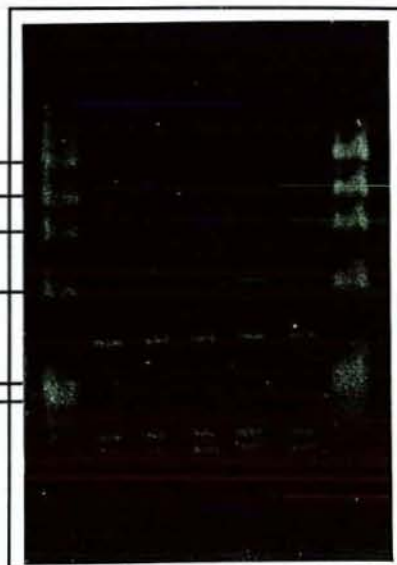


M 94 95 96 M



M 97 98 99 100 101 M

1353 pb
1078 pb
872 pb
603 pb
310 pb
278 pb



- M ADN du phage Φ X 174 digéré par *Hae* III
M' ADN du phage pBR 328 digéré par *Bgl* I + ADN du phage pBR 328 digéré par *Hinf* I
C Témoin négatif
72 *Mitrophora semilibera* 952(3)
73 *Disciotis venosa* Noyon
74 *Mitrophora semilibera* 952(4)
75 *Morchella costata* (Pas de calais)
76 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (Pas de calais)
77 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 2
78 *Morchella spongiola* var. *dunensis* Du 3
79 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (Quiberon)
80 *Morchella spongiola* var. *dunensis* (La Tranche sur Mer)
81 *Morchella conica* Co 1
82 *Morchella conica* Co 2
83 *Morchella conica* Co 3
84 *Morchella conica* Co 4
85 *Morchella elata* 1
86 *Mitrophora semilibera* PH3
87 *Mitrophora semilibera* PH2
88 *Mitrophora semilibera* PH1
89 *Mitrophora semilibera* m 952(6)
90 *Mitrophora semilibera* m 952(5)
91 *Mitrophora semilibera* m 952(1)
92 *Mitrophora semilibera* 952(7)
93 *Mitrophora semilibera* 952(8)
94 *Morchella elata* Aus 1
95 *Morchella elata* Aus 2
96 *Morchella elata* NZ
97 *Morchella conica* MoIs 5
98 *Morchella conica* 2
99 *Morchella conica* 4
100 *Morchella elata* 1
101 Sclérote à proximité de *Pinus banksiana*

Annexe 4: Publication 7

Phylogenetic analysis of the European Armillaria species based on the sequences of the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA.

Chillali, M., D. Wipf, J.J. Guillaumin, C. Mohammed & B. Botton (accepté pour publication)

The New Phytologist

J'ai collaboré avec M. Chillali dans le cadre d'une étude phylogénétique des armillaires européennes pour laquelle j'ai mis en forme et exploité les résultats du séquençage de la région ITS de différentes souches. Le présent article est issu de cette collaboration.

Delineation of the European *Armillaria* species based on the sequences of the Internal Transcribed Spacer (ITS) of ribosomal DNA

By Mohammed CHILLALI¹, Daniel WIPF¹, Jean-Jacques GUILLAUMIN², Caroline MOHAMMED³ and Bernard BOTTON^{1*}

¹ Université Henri Poincaré Nancy 1, Laboratoire de Biologie Forestière associé INRA, BP 239, 54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex, France

² Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire de Mycologie, Domaine de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand Cédex, France

³ University of Tasmania, Department of Agricultural Science, BPO Box 252C, Hobart, Tasmania 7001, Australia

Short Title: Sequencing of the ITS region of rDNA in *Armillaria*

Corresponding author:

BOTTON Bernard, Université Henri Poincaré Nancy I, Laboratoire de Biologie Forestière associé INRA, BP 239, F-54506 Vandoeuvre les Nancy Cédex, France

Tél: (33) 03 83 91 22 39

Fax: (33) 03 83 90 32 77

E-mail: botton@scbiol.u-nancy.fr

*To whom correspondence should be addressed

SUMMARY

Variations within the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal RNA gene of fifteen isolates representing seven European *Armillaria* species, were examined by sequencing of the PCR-amplified products. The analysis of an 744-bp region showed that the 5.8S gene appeared to be highly homologous in the fifteen isolates and in further Basidiomycetes and Ascomycetes, while ITS1 and especially ITS2 spacers exhibited polymorphisms due to base substitutions, insertions or deletions of up to eight nucleotides. An initial dendrogram for the full sequence was drawn using cluster analysis (UPGMA), and a tree was then constructed using the neighbor-joining method. The similarity matrix and the resulting dendrogram and tree indicated that the isolates could be divided into four major groups. One group, consisting of *A. ectypa*, was distinct from all the other species. Examination of the other groups indicated that *A. tabescens* and *A. mellea* were in a separated cluster, with a significant variation between the two isolates of the latter species. *A. gallica* and *A. cepistipes* constituted another closely related group distinguishable from those of *A. ostoyae* and *A. borealis*, these latter two species exhibiting the highest similarity. The results are consistent with, and discussed in regard to, the relationships estimated previously by pairing tests, morphological and physiological comparisons, as well as by restriction fragment length polymorphism of the rDNA.

Key words: *Armillaria*, biological species, direct sequencing, internal transcribed spacer, phylogeny, ribosomal DNA.

INTRODUCTION

The genus *Armillaria* (Fr.:Fr.) Staude is a serious pathogen causing root rot to a broad host range of plants, all over the world (Shaw & Kile, 1991). In Europe, there exists seven intersterile groups or biological species (Korhonen 1978; Guillaumin *et al.*, 1993). Two species are characterized by an exannulate basidioma and by the absence of subterranean rhizomorphs in field conditions: *Armillaria tabescens* (Scopoli: Fries) Emel, and *Armillaria ectypa* (Fries) Lamoure. Five species have an annulate basidioma: *Armillaria mellea* (Vahl: Fries) Kummer, *Armillaria gallica* Marxmuller and Romagnesi (synonymous: *Armillaria bulbosa* (Barla) Velenovsky), *Armillaria cepistipes* Velenovsky, *Armillaria borealis* Marxmuller and Korhonen, and *Armillaria ostoyae* (Romagnesi) Herink. *A. gallica* and *A. cepistipes* are similar in the morphology of their mycelia and fruit bodies and are also characterized by low pathogenicity to trees and high saprophytic abilities. *A. borealis* is localized in northern European areas.

Identification of *Armillaria* biological species is currently effected by testing the compatibility of unknown isolates with tester strains from each species (Korhonen, 1978). Mating interactions, however, are not always the best means for identifying *Armillaria* species. Indeed, vegetative organs such as mycelium or rhizomorphs collected from the field, are diploid, and the tests between diploids and haploid (based on the "Buller phenomena") testers are often interpreted with difficulty. Fortunately, several *Armillaria* species can be distinguished

by observations of mycelial mats and fruit body morphology. However this criterium is sensitive to environmental changes and the pairs such as *A. borealis* and *A. ostoyae*, *A. mellea* and *A. tabescens*, as well as *Armillaria cepistipes* and *Armillaria gallica*, are very similar morphologically (Guillaumin *et al.*, 1993). These methods are time-consuming and require up to two months for identification after isolation in pure culture. Immunological techniques (Lung-Escarment, Mohammed & Dunez, 1985), protein profiles (Mohammed & Guillaumin, 1993) and isozyme analysis (Morrison *et al.*, 1985; Agustian *et al.*, 1994) have been tentatively used for evaluating phylogenetic relationships in *Armillaria* isolates originating from several continents. The most significant advances in taxonomy in general are coming from approaches based on analysis of DNA sequences. These include DNA reassociation (Miller *et al.*, 1994), analysis of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) (Mohammed, 1994), and analysis of restriction-fragment-length polymorphisms (RFLPs) (Jahnke, Bahnweg & Worrall, 1987; Anderson, Petsche & Smith, 1987; Smith & Anderson, 1989; Anderson, Bailey & Pukkila, 1989). However, these procedures can also be difficult to standardize and sensitivity can vary (Guthrie *et al.*, 1992). In contrast, DNA sequences provide definitive data that can be stored and readily compared with information derived from different laboratories (Bruns, White & Taylor, 1991). Such approaches have already been used in phylogenetic studies of *Armillaria*. Through sequencing of the intergenic spacer of ribosomal DNA, Anderson and Stasovski (1992) distinguished *A. borealis* and *A. ostoyae*, which, however, were closely related to each other, and a distinct group composed of *A. cepistipes* and *A. gallica*.

Polymerase chain reaction combined with RFLP techniques have been used recently to clarify the species in the European *Armillaria* complex (Chillali *et al.*, 1996). It was found that *A. ectypa* had the most pronounced dissimilarity with the other isolates, followed by *A. tabescens*. Among the five other species analyzed, including *A. mellea*, *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. borealis* and *A. ostoyae*, all exannulate and forming the "mellea complex", *A. mellea* was clearly in a distinct cluster, while the other species were close to each other. However, two subgroups were distinguished, the first comprising *A. gallica* and *A. cepistipes*, the second including *A. borealis* and *A. ostoyae*.

These species have different pathogenic behaviour, *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. borealis* and *A. tabescens* are generally considered as very weak parasites, while *A. mellea* can be a serious destructive agent of deciduous forest trees, orchard trees, grapevine and amenity trees, and *A. ostoyae* of conifers (Guillaumin *et al.*, 1985; Kile, McDonald & Byler, 1991; Wargo & Harrington, 1991). Thus, it is of importance for forest management, to know what species of *Armillaria* really exist in the different types of natural forest, especially distribution of the most aggressive species.

The present paper describes the sequences of the ITS of 15 isolates of *Armillaria*, chosen to be representative of the seven European species. Their rDNA was analyzed to determine sequence homologies and to reveal taxonomic relationships between the isolates and to identify

smaller regions of the rDNA that reveal similar relationships and, hence, facilitate studies on a larger number of isolates.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates

All isolates originating from several countries were obtained from a collection of *Armillaria* cultures maintained at the INRA Center of Clermont-Ferrand (Dr. J.J. Guillaumin) and at the Higher Agriculture School of Bordeaux-Gradignan (Dr. B. Lung). Fifteen isolates representing seven species were chosen for the present study (Table 1) based on morphological and physiological characters, as well as geographic origins.

Strain Cultivation and DNA extraction

All isolates were grown in test tubes from a sterile orange fragment supported above a column of Pachlewski's liquid medium as described by Agustian *et al.*, (1994). Mycelial cords growing into the medium were washed twice with sterile distilled water, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and stored at -80°C until DNA extraction. Total DNA was extracted from a few mg according to the procedure of Henrion, Le Tacon & Martin, (1992), resuspended in 50 µl of 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 2.5 mM EDTA and stored at 4°C until use.

ITS- amplification

The primers ITS1 and ITS4 used allow amplification of ITS region, plus a small portion of 3' end of the 17S rDNA and of 5' end of the 25S rDNA, respectively, corresponding to the primer regions (White *et al.*, 1990). The primers were synthesized and supplied by Bioprobe systems (Montreuil sous Bois, France). The PCR procedure used was described by Henrion, Chevalier & Martin, (1994). Briefly, reactants for amplification were combined in 0.5 ml polypropylene tubes to give a net volume of 100 µl and concentrations of 10 mM-Tris-HCl (pH8.8 at 25°C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1% Triton X100, 0.1% gelatin, 20 pmol of each set of relevant unpurified primers, 200 µM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP and 0.05 to 0.5 ng DNA template (50 µl of 20 to 1000-fold water dilution of the DNA extract). Following this, 2.5 units of Taq DNA polymerase (Amersham, ref. number RPN 0303Z) were added to the tube content which was overlaid with two droplets of mineral oil (Sigma). The charged tubes were immediately placed into a "Crocodile II" thermocycler (Appligene, Pleasantons, CA), functioning under tube temperature control mode. The thermal cycling parameters were an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles (denaturation at 94°C for 2 min, annealing at 50°C for 50 sec, extension at 72°C for 2 min) and a final extension at 72°C for 10 min. Controls without DNA were made to rule out the presence of contaminants in the reagents and reaction buffers.

DNA sequencing

The amplicates were purified by using a PCR purification column (Qiaquick-spin from Qiagen, Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Sequencing of the purified products was carried out by "Euro Sequences Genes Services", (Montigny le Bretonneux, France) using a 373 DNA sequencer (Applied Biosystems Inc.) and the AmpliTaq DNA polymerase sequencing kit (Perkin-Elmer).

Sequence Analysis

Sequence data were stored, assembled, and analyzed using the biosequence editor and analysis application SeqApp version 1.9 (Henrion *et al.*, 1992) on an Apple Macintosh II SI computer. The multiple alignment of the sequences and the UPGMA analysis were performed using the Clustal V package (Higgins, Bleasby & Fuchs, 1992) interfaced to SeqApp 1.9 (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) and Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) program 3.1.1 were used to calculate distance matrices and to reconstruct phylogenies by the Parsimony method (Swofford, 1993). Nucleotide sequence comparisons were also performed at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) network service (Altschul *et al.*, 1990) against the NCBI databases (Non-redundant PDB + GBupdate + GenBank + EMBLupdate + EMBL; May 1, 1996). The whole procedure (cultivation, DNA extraction, ITS amplification and sequencing) was performed twice for all isolates.

GenBank accession numbers

GenBank accession numbers for all isolates are listed in Table 1.

Results

DNA sequence

For each of the 15 isolates the longest region that was sequenced extended over 840 nucleotides; however, sequence data taken into account were confined to 744 bases, as two approximate 48 bp regions located respectively to the 3' end of the 17S rDNA, and to the 5' end region of the 28S rDNA were removed, due to the uncertainty in the determination of a few nucleotides. The high homologies with the 5.8S rDNA of other basidiomycetes (not shown) allowed localization of the 5.8S gene and of the ITS1 and ITS2 spacers in the isolates (Fig 1).

There was considerable sequence variation in the ITS sequences, due to base substitutions, insertions or deletions of up to eight nucleotides; by contrast, there was little variation in the regions coding for the 5.8S rRNAs. The ITS1 showed less variation than the ITS2. Overall ITS1 contained 47 variable sites, of which 26 were phylogenetically informative, while ITS2 had 161 variable sites of which 68 were informative. The 5.8S rDNA had 7 variable

sites and 2 of which were informative. There was very little variation in the upstream region of the 5.8S coding region, especially in the stretch between nucleotides 160 and 176 where a TATA sequence was located at nucleotide 171. The 5.8S region of the *Armillaria* isolates had a high sequence homology (95 to 96%) with the 5.8S region of other Basidiomycetes such as the genera *Volvariella*, *Heterobasidium* and *Rhizoctonia* (not shown). A high homology was also obvious with several Ascomycetes belonging to the genera *Alternaria* and *Pleospora* (94 to 95%). Homology was slightly reduced (90 to 92%) in others Basidiomycetes belonging mainly to the genus *Lentinula*. A BLAST search performed either from ITS1 or from ITS2 revealed no high homology with the GenBank data.

Analysis of data using hierarchical clustering

Table 2 shows pairwise comparisons expressed as the number of site position differences (upper triangle) and as the percentage similarities (lower triangle). A similarity matrix based on comparisons of these sequences revealed that all the *Armillaria* isolates had variable nucleotide sequences, with similarities ranging from 58.3 to 99.8 between species within the entire region that was sequenced.

A group average (UPGMA) cluster analysis of these percentage similarities is given as a dendrogram in Figure 2. These preliminary analyses separated the isolates into four distinct groups, each containing isolates with a percentage similarity greater than 83%. The first group including *A. borealis* and *A. ostoyae*, was highly homogeneous with an average within group similarity (AWGS) of 97.7%. Within this group, a slight difference of about 3% dissimilarity separated the two species. The second group included *A. cepistipes* and *A. gallica* with an AWGS of 92% and was also divided into two subgroups corresponding to each species. The third group consisting of *A. mellea* and *A. tabescens* was more variable (AWGS: 83.7%), but however revealed a distinct grouping for both species. The fourth separate group was composed of *A. ectypa* with 72 % similarity with the other isolates.

Analysis using the Parsimony method

The similarity matrix and the corresponding tree obtained by the Similarity method revealed approximatively the same groupings (Fig. 3), as in the dendrogram from the cluster analysis. However, the third group including *A. mellea* and *A. tabescens* revealed heterogeneity in the former species. Indeed, the M2 isolate appeared as a subgroup linked to *A. borealis*, *A. ostoyae*, *A. cepistipes* and *A. gallica*, while the M1 isolate gave rise to an additional branch linked to M2 and *A. tabescens*. This heterogeneity between M1 and M2 is emphasized by a genetic distance of 0.06 and a 45 nucleotide difference (Table 2). By contrast, intraspecific variation was very low in a number of species, especially in *A. borealis* (5 site difference), *A. ostoyae* (7 site difference) and *A. ectypa* which was the most divergent species, but nevertheless represented a closely related group with a 13 nucleotide difference between the two isolates. Although the *A. cepistipes* and *A. gallica* isolates were split into two subgroups, the parsimony

method indicated that the C2 isolate was very close to the *A. gallica* species. Indeed, the genetic distance found between the couples C2 - G1 and C2 - G2 was 0.020 and 0.016, respectively, while it was 0.024 between C1 and C2 (Fig. 3).

DISCUSSION

Ribosomal DNA sequences, in particular the 5.8S rDNA and flanking internal transcribed spacer regions ITS1 and ITS2, have been used to study the phylogenetic relationships for a number of plant pathogenic fungi (Jasalavich *et al.*, 1995; Morales *et al.*, 1995), including the genus *Armillaria* (Anderson & Stasovski, 1992). However, ribosomal RNA genes are present in a large number of copies in each cell, while a taxonomically ideal molecule should exist in a single copy. Indeed, several studies showed different versions of ribosomal genes within single genomes or among strains in several groups of fungi (Martin, 1990; O'Donnell, 1992). This heterogeneity indicates the necessity to duplicate all steps of the rRNA gene sequencing procedure and a supplementary precaution is obtained by sequencing rDNA in both directions (Wipf *et al.*, 1996). Following such recommendations, the present work allowed successful sequencing of the ITS region in the different *Armillaria* species and no difference between sequences was found between the duplicates. Furthermore, high homologies with the 5.8S gene of other Basidiomycetes and Ascomycetes indicated that the sequences investigated corresponded effectively to the ITS region of *Armillaria*. The highest sequence segment pairing was restricted to the 5.8S DNA, which is consistent with the well established fact that coding regions of rDNA are better conserved (Rollo, Sassaroli & Ubaldi, 1995).

Cluster analysis of the sequenced ITS region gave results that fit well with classical taxonomic criteria. Species that could be distinguished on morphological grounds were easily separated by ribosomal DNA sequence data, including closely related ones. *A. ectypa* was easily distinguished from the other six species investigated, confirming that it is not closely related to them. Indeed, *A. ectypa*, only known in Europe, differs from all the other European *Armillaria* species by its homothallic mode of reproduction (Guillaumin, 1973) and its ecological niche in peat bogs. It is likely that, in the course of evolution, this species early separated from the forest *Armillaria*. *A. tabescens* was also assigned to a distinct and fairly homogeneous group. This species shares with *A. ectypa* an exannulate stipe and the absence of subterranean rhizomorphs in nature. These two characteristics distinguish *A. tabescens* from the other forest species, from which it probably separated fairly early. However, it is possible that *A. tabescens* from Europe and from the USA constitute two different species (Kile *et al.*, 1994), that could suggest a more complex evolution. Cluster analysis showed that *A. mellea*, although belonging to a sub-group, was closest to *A. tabescens*, with 83.7% similarity between each other. Bootstrap analysis confirmed these data, but moreover indicated that the M1 and M2 isolates were in distinct clusters, the former isolate being more divergent from *A. tabescens*. Using DNA reassociation experiments, Miller *et al.*, (1994) showed that, among North American isolates, *A. tabescens*

was closely related to *A. mellea*. *A. mellea* and *A. tabescens* are restricted to hardwood forest of low altitude and latitude in Europe, the latter being less common. While the rhizomorphs of *A. tabescens* are absent in nature, those of *A. mellea* are fragile and short living, and only rarely found in nature (Mohammed, 1987; Legrand & Guillaumin, 1993). Fruit bodies of *A. mellea* and *A. tabescens* are however sufficiently distinctive to reliably separate these species from one another, although mycelial mats have similar morphologies (Guillaumin *et al.*, 1993). Anderson and Stasovski (1992) showed that the morphological divergence in both species, roughly paralleled divergence in rDNA. *A. mellea* has already been described as one of the most divergent species, based on morphological attributes such as robust stature, prominent annulus, yellow color found intracellularly (Bérubé & Dessureault, 1988), complete lack of clamp connections in fruit-bodies and in matings (Korhonen, 1978), and a strikingly larger rDNA repeat (2.5 kb) than any of the other species including *A. gallica*, *A. cepistipes*, *A. ostoyae* and *A. borealis* (Anderson *et al.*, 1989).

A. cepistipes and *A. gallica* formed another distinct cluster with two subgroups of 92% similarity corresponding to each of the two species. This is in agreement with their similar morphological and ecological characteristics, both species having identical mycelial mats, fruit bodies and long living subterranean rhizomorphs (Guillaumin *et al.*, 1993; Marxmüller, 1994). Their main difference would lie in different temperature requirements, as according to Mohammed (1987), the optimum for growth of *A. cepistipes* is 22°C and 25°C for *A. gallica*. Interestingly, Anderson *et al.*, (1989) showed that these two species have a 0.4 kb insertion in the 5' end of the 26S rDNA, which was absent in the other species examined. All these characteristics are indicative that the separation of these two sympatric species is probably a recent event.

The remaining two species are *A. borealis* and *A. ostoyae* which are closely related to each other with 97% similarity. However, pattern of similarity and bootstrap analysis for the whole sequences, made a distinction of the two species. Sequence data revealed a slight heterogeneity in the *A. ostoyae* isolates, as one site difference distinguished O2 and O3, while 7 and 8 site differences separated these isolates from O1. However, it must be noted that the three isolates examined here have the same geographical origins. *A. ostoyae* is distributed widely in temperate regions of Europe with a similar counterpart in North America (group I) partially interfertile with the European isolates (Anderson, Korhonen & Ullrich, 1980). This species is often highly pathogenic on conifers but may also parasitize hardwoods. *A. borealis* also parasitizes both conifers and hardwoods, but is distributed only in northern Europe and is intersterile with all the other biological species from North America and Europe. Anderson *et al.*, (1989) showed that, relative to the European *A. ostoyae*, *A. borealis* had an additional *Pst* I restriction site and was missing another similar restriction site in its rDNA. According to these authors, a reasonable hypothesis is that *A. borealis* is closely related to *A. ostoyae* and group I, and may be derived from these latter more widely distributed, as a geographically restricted population. Similar relationship was found when data were based on direct sequencing of the

intergenic region from the 3' end of the 26S gene to the 5' end of the 5S gene of the rDNA (Anderson & Stasovski, 1992). Two types of *A. borealis* isolates, named A and B, were formerly described on the basis of the *Alu* I restriction sites, similar to that of *A. ostoyae* for the former type, and different for the latter type (Anderson & Stasovski, 1992; Harrington & Wingfield, 1995). As previous investigations based on RFLP showed that the *A. borealis* isolates studied in this work were obviously of type B (Chillali *et al.*, 1997), consequently there exists some *A. borealis* isolates more closely related to *A. ostoyae* than those used in the present study.

These results are fully consistent with previously established relationships between these groups, determined by morphological and physiological characters (Guillaumin *et al.*, 1993), but also by PCR/RFLP (Harrington & Wingfield, 1995; Chillali *et al.*, 1997), analysis of the rDNA restriction maps (Anderson *et al.*, 1989) and sequencing of the intergenic region of the rDNA (Anderson & Stasovski, 1992). Previous work based on sequence comparisons of the ITS1 region, was only capable of separating *A. mellea* and *A. ectypa* from the other European species (Chillali *et al.*, 1997). This study has shown that more variability lies in the ITS 2 region which should be suitable for establishing a routine taxonomy study based on a large number of isolates. The present sequence data from the whole ITS segment have provided a sound delineation of the biological species within the European *Armillaria* complex. However, additional data from the rDNA segment and other nuclear or mitochondrial genes, with more highly conserved sequences, could help in resolving the phylogenetic relationships, especially of the more distantly related *Armillaria* species, in the context of morphological divergence and biogeography.

REFERENCES

- Agustian A, Mohammed C, Guillaumin JJ, Botton B. 1994. Discrimination of some African *Armillaria* species by isozyme electrophoretic analysis. *New Phytologist* **128**: 135-143.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Anderson JB, Bailey SS, Pukkila PJ. 1989. Variation in ribosomal DNA among biological species of *Armillaria*, a genus of root-infecting fungi. *Evolution* **43**: 1652-1662.
- Anderson JB, Korhonen K, Ullrich RC. 1980. Relationships between European and North American biological species of *Armillaria mellea*. *Experimental Mycology* **4**: 87-95.
- Anderson JB, Petsche DM, Smith ML. 1987. Restriction fragment polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. *Mycologia* **79**: 69-76.

- Anderson JB, Stasovski E. 1992.** Molecular phylogeny of northern hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* **84**: 505-516.
- Bérubé JA, Dessureault M. 1988.** Morphological characterization of *Armillaria ostoyae* and *Armillaria sinapina* sp. nov. *Canadian Journal of Botany* **66**: 2027-2034.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991.** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**: 525-564.
- Chillali M, Idder-Ighili H, Guillaumin JJ, Mohammed C, Lung B, Botton B. 1996.** Identification of European *Armillaria* by analysis of the amplified ITS and IGS regions of ribosomal DNA. *Mycological Research* (in press).
- Guillaumin JJ. 1973.** Etude du cycle caryologique de deux espèces appartenant au genre *Armillaria*. *Annals of Phytopathology* **5**: 317.
- Guillaumin JJ, Lung B, Mohammed C, Anselmi N, Courtecuisse R, Gregory SC, Holdenrieder O, Intini M, Lung B, Marxmüller H, Morrison D, Rishbeth J, Termorshuizen AJ, Tirro A, Van Dam B. 1993.** Geographical distribution and ecology of the *Armillaria* species in western Europe. *European Journal of Forest Pathology* **23**: 321-341.
- Guillaumin JJ, Lung B, Romagnesi H, Marxmüller H, Lamoure D, Durrieu G, Berthelay S, Mohammed C. 1985.** Systématique des Armillaires du groupe *mellea*. Conséquences phytopathologiques. *European Journal of Forest Pathology* **15**: 268-277.
- Guthrie PAI, Magill CW, Frederiksen RA, Odvody GN. 1992.** Random amplified polymorphic DNA markers. A system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **82**: 832-835.
- Harrington TC, Wingfield B. 1995.** A PCR-based identification method for species of *Armillaria*. *Mycologia* **87**: 280-287.
- 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.
- Henrion B, Chevalier G, Martin F. 1994.** Typing truffles species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* **98**: 37-43.
- Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. 1992.** Improved software for multiple sequence alignment. *Cabios* **8**: 189-191.

- Jahnke K-D, Bahnweg G, Worrall JJ. 1987.** Species delimitation in the *Armillaria mellea* complex by analysis of nuclear and mitochondrial DNAs. *Transactions of the British Mycological Society* **88**: 572-575.
- Jasalavich CA, Morales VM, Pelcher LE, Séguin-Swartz G. 1995.** Comparison of nuclear ribosomal DNA sequences from *Alternaria* species pathogenic to crucifers. *Mycological Research* **99**: 604-614.
- Korhonen K. 1978.** Interfertility and clonal size in the *Armillariella mellea* complex. *Karstenia* **18**: 31-42.
- Kile GA, Guillaumin JJ, Mohammed C, Watling R. 1994.** Biogeography and pathology of *Armillaria*. In: Johannsson M, Stenlid J, eds. *Proceedings of the 8th international conference on rot and but rots*. Uppsala, Sweden: IUFRO working party S 750.07, pp 411-436.
- Kile GA, McDonald GI, Byler J.W. 1991.** Ecology and disease in natural forests. In: Shaw CG, Kile GA, eds. *Armillaria root disease*. Forest service, United States Department of Agriculture. *Agriculture Handbook* No. **691**: 102-121.
- Legrand P, Guillaumin JJ. 1993.** *Armillaria* species in the forest ecosystems of the Auvergne (Central France). *Acta Oecologica* **14**: 389-403.
- Lung-Escarmant B, Mohammed C, Dunez J. 1985.** Nouvelles méthodes de détermination des *Armillaires* Européens: Immunologie et électrophorèse en gel de polyacrylamide. *European Journal of Forest Pathology* **15**: 278-288.
- Martin FN. 1990.** Variation in the ribosomal DNA repeat unit within single-oospore isolates of the genus *Pythium*. *Genome* **33**: 585-591.
- Marxmüller H. 1994.** Sur la morphologie en culture du mycélium secondaire chez les *Armillaires* annelées. *Bulletin de la Société Mycologique de France* **110**: 43-80.
- Miller OK, Johnson JL, Burdsall HH, Flynn T. 1994.** Species delimitation in North American species of *Armillaria* as measured by DNA reassociation. *Mycological Research* **98**: 1005-1011.
- Mohammed C. 1987.** Etude comparée des cinq espèces d'*Armillaria* appartenant au complexe *mellea*. Dissertation Thesis, University Clermont-Ferrand II, 208 p.
- Mohammed C. 1994.** The detection and species identification of African *Armillaria*. In: Schots A, Dewey FM, Oliver R, eds. *Modern detection assays for plant pathogenic fungi*. Cambridge: CAB International, U.P pp 141-147.

- Mohammed C, Guillaumin JJ. 1993.** *Armillaria* in tropical Africa. In : Frankland JC, Watling R, Whalley AJS, eds. *Aspects of tropical mycology*. S.ISAAC. British Mycological Society Symposium Series. Cambridge: Cambridge University Press, 207-217.
- Morales VM, Jasalavich C.A, Pelcher LE, Petrie GA, Taylor JL. 1995.** Phylogenetic relationship among several *Leptosphaeria* species based on their ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **99**: 593-603.
- Morrison DJ, Thomson AJ, Chu D, Peet FG, Sahota TS. 1985.** Isozyme patterns of *Armillaria* intersterility groups occurring in British Columbia. *Canadian Journal of Microbiology* **31**: 651-653.
- O'Donnell K. 1992.** Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* **22**: 213-220.
- Rollo F, Sassaroli S, Ubaldi M. 1995.** Molecular phylogeny of the fungi of the Iceman's grass clothing. *Current Genetics* **28**: 289-297.
- Shaw CG, Kile GA. 1991.** *Armillaria Root Disease*. In: Shaw CG, Kile GA, eds. *Armillaria root disease*. Forest service, United States Department of Agriculture. *Agriculture Handbook* No. **691**.
- Smith ML, Anderson JB. 1989.** Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNAs of *Armillaria*: identification of North American biological species. *Mycological Research* **93**: 247-256.
- Swofford DL. 1993.** PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony, version 3. 1. 1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey: Champaign, IL, U.S.A.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Wargo PM, Harrington TC. 1991.** Host stress and susceptibility. In: Shaw CG, Kile GA, eds. *Armillaria root disease*. Forest service, United States Department of Agriculture. *Agriculture Handbook* No. **691**: 88-101.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In M.A. Innis, D.H. Gelfand,

J.J. Sninsky and T.J. White (ed.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego.

Wipf D, Munch JC, Botton B, Buscot F. 1996. DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3541-3543.

Legends of the Figures

Fig. 1: Aligned sequences of the ITS region of *Armillaria* isolates. Strain numbers are indicated at left. In the aligned sequences, a dash indicates a missing base and a white area a mismatch. Position of the 5.8S rDNA gene is indicated between arrows.

Fig. 2: Dendrogram illustrating relatedness of the *Armillaria* isolates, based on cluster analysis.

Fig. 3: Tree based on the Parcimony analysis of the nucleotide sequences of the ITS region in 15 European *Armillaria* isolates. The complete alignment was based on 744 sites. The bootstrap data were acquired by sampling sites 1000 times. Bootstrap values are indicated at the nodes of the dendrogram. Branch lengths (drawn in the horizontal dimension only) are proportional to phylogenetic distance. The length of vertical lines has no meaning and was adjusted arbitrarily for ease in labelling termini.

Fig. 1

	5	15	25	35	45
B1	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
B2	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
O1	GAGAACTGTT	GCTCACCCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
O2	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
O3	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
C1	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
C2	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
G1	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
G2	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
M1	GAGAGCTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCAAAGTGTT
M2	GAGAGCTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCAAAGTGTT
T1	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
T2	GAGAACTGTT	GCTGACCTGT	TAA--AGGGT	ATGTGCACGT	TCGACGTGTT
E1	GAGAACTGTT	GCTGACCTTG	TAA TAAGGGT	ATGTGCACGT	TCAAAGTGTT
E2	GAGAACTGTT	GCTGACCTTG	TAA TAAGGGT	ATGTGCACGT	TCAAAGTGTT

	55	65	75	85	95
B1	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
B2	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
O1	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
O2	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
O3	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
C1	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
C2	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
G1	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
G2	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AGCTT
M1	ACTGGTTCTG	TTCTATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GGTTGAGCTT
M2	ACTGGTTCTG	TTCTATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GGTTGAGCTT
T1	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
T2	GC--GTTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GATT-AACTT
E1	GCGTGTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GGTT-AGCTT
E2	GCGTGTCTA	TTC-ATCCAC	CTGTGCACCT	TTGTAGACTT	GGTT-AGCTT

	105	115	125	135	145
B1	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
B2	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
O1	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---CCGAGCT	---CCC-CTT
O2	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
O3	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
C1	TCGCTTTCGA	GCGGTTAGAA	GGGCTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
C2	TCGCTTTCGA	GCGGTTAGAA	GGGCTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
G1	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
G2	TCGCTCTCGA	GCGGTTAGAA	GGGTTGCTT-	---TCGAGCT	---CCC-TTT
M1	TCGCTTTCGA	GCGGCTTGAA	GGGTTGCTTG	CTTACGAGCT	AAGCCCGTCT-
M2	TCGCTTTCGA	GCGGTTTGAA	GGGTTGCTTG	CTTTCGAGCT	AAGCCCGTCTT
T1	TCGCTTTCGA	GCGGTTAGAA	GGGCTGCTT-	---TCGAGCT	----CCCTTT
T2	TCGCTTTCGA	GCGGTTAGAA	GGGCTGCTT-	---TCGAGCT	----CCCTTT
E1	TCGCTTAGG	ACGGATAGGA	AGG--G-TTG	CTTAGGGCT	----CCCTTT
E2	TCGCTTAGG	ACGGATAGGA	AGG--G-TTG	CTTAGGGCT	----CCCTTT

	155	165	175	185	195
B1	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
B2	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
O1	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
O2	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
O3	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
C1	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
C2	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
G1	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
G2	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
M1	GTCTTACCGA	GTCTATGTCT	ATATAAACTT	TTGTA TGTTT	-AGAATGTCT
M2	GTCTTACCGA	GTCTATGTCT	ATATAAACTT	TTGTA TGTTT	-AGAATGTCT
T1	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
T2	GTCT-ATCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	-AGAATGTCT
E1	GTGT-ACCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	TAGAA TGTCT
E2	GTGT-ACCAA	GTCTATGTCT	ATATAATCTC	TTGTA TGTCT	TAGAA TGTCT

ITS1 Spacer ← → 5.8S Gene

	205	215	225	235	245
B1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
B2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
O1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
O2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
O3	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
C1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
C2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
G1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
G2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
M1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
M2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
T1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
T2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
E1	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA
E2	TGTTTA TGGG	ACGCAAGTCC	TTTAAATC TT	ATACAAC TTT	CAACAAC GGA

	255	265	275	285	295
B1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
B2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
O1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
O2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
O3	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
C1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
C2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
G1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
G2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
M1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
M2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
T1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
T2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
E1	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T
E2	TC TCT TGGC T	CTCGCA TCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAA TGC	GATAAC TAA T

	305	315	325	335	345
B1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
B2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
O1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
O2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
O3	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
C1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTCTGAACG	CACCTTGCGC
C2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
G1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
G2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
M1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AACCATCGAG	TCTTTGAACG	GAACCTTGCGC
M2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
T1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
T2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAG	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
E1	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC
E2	GTGAA TTGCA	GAA TTCAGTG	AATCATCGAA	TCTTTGAACG	CACCTTGCGC

5.8S Gene ← → ITS2 Spacer

	335	365	375	385	395
B1	CCTTTGGCTA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
B2	CCTTTGGCTA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
O1	CCTTTGGCTA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
O2	CCTTTGGCTA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
O3	CCTTTGGCTA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
C1	CCTTTGG-TA	TTCC-CAA-G	GGCATGACCC	CTTGAGT-G	TACATCAA-T
C2	CCTTTGG-TA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
G1	CCTTTGGGTA	TTCCGAAG-G	GGCATGCC TG	TTTGAGT-TG	TACATTAAT
G2	CCTTTGGGTA	TTCCCAA-G	GGCATGCC TG	TTTGAGT-TG	TACATTAAT
M1	CCTTTGGC-A	TTTCGAAACG	GGAATGCCCT	CCTGGAGCTG	TACATCTAT
M2	CCTTTGG-TA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	GTTGAG--TG	TACATTAAT
T1	CCTTTGG-TA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
T2	CCTTTGG-TA	TTCCG-AA-G	GGCATGCC TG	TTTGAG--TG	TACATTAAT
E1	CCCTTGG-TA	TTCCAGA---	GGAATGCC TG	TTCCGA-CTC	CATACC---C
E2	CCCTTGG-TA	TTCCAGA---	GGAATGCC TG	TTCCGA-CTC	CATACC---C

	405	415	425	435	445
B1	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	AATCA-GCTC
B2	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTCCTGGTT	T-CTAACGA-	AAGCA-GCTC
O1	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
O2	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
O3	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
C1	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	CTTCCTGGTT	TACTGACGAA	GATCAAGCTC
C2	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
G1	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTCCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
G2	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTG-TT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
M1	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTC	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
M2	TCTCAA TTGG	TACA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
T1	TCTCAA TTGG	T-TA TGGGGG	TTTGCTGGTT	T-CTA-CGA-	GATCAAGCTC
T2	TCTCAA TTGG	T-TA TGGGGG	TTTGCTGGTC	T-CTAACGA-	GATCAAGCTC
E1	TCTCAA TTGG	T-TA TGGGGG	TTTTCTGGTC	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC
E2	TCTCAA TTGG	T--A TGGGGG	TTTTCTGGTC	T-CTAACGA-	GATCA-GCTC

	455	465	475	485	495
B1	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAGCC-GTTT	GACTCTGGCT	GCTAGGCTGT
B2	CTCTGAAAAT	GCATTAGCAG	AATCC-GTTT	GACTCTGGCT	GCTAGCCTGT
O1	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
O2	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
O3	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
C1	CTCTGAAA-T	GCAC TAACAG	AAACC-GTTT	GACTGTGGCT	GCGAGCCTGT
C2	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
G1	CTCTGAAA-T	GCATAAGCAG	AAGCC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
G2	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAGCC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
M1	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAGCC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
M2	CTCTGAAA-T	GCATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
T1	CTCTTGAAAAT	GCAT -AACAA	GAACC-GTTT	G -CCTGGCT	-CCAGGCTGT
T2	CTCTTGAAAAT	GCATTAGCAG	AAACCCTGTT	GACTTTGGCT	GCTAGGCTGT
E1	CTCTGAAA-T	GTATTAGCAG	AAACC-GTTT	GACATTGGCT	GCTAGGCTGT
E2	CTCTGAGA-T	GTTGTAGCAG	AAGCC-GCTT	GATAGTGGCT	GCTAGGCTGT

	505	515	525	535	545
B1	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	GTAGTTGGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
B2	GATAAT--AT	CAACGCCTTG	GTAGTTGGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
O1	GATAAT--AT	CAACGCCTTG	GTAGTTGGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
O2	GATAAT--AT	CAACGCCTTG	GTAGTTGGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
O3	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	GTAGTTGGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
C1	GATAAT--AT	CGACACCTTG	-TAGTTAGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
C2	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	-TAGTTAGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
G1	GATAAT--AT	CTACGCCCTTG	-TAAGTAGGT	CGGAA -ACGA	GTCA TACAGT
G2	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	-TAGTTAGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
M1	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	GTAGTCGGGT	TGGAA TACGA	GTGA TACAGT
M2	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	-TAGTTAGGT	CGGAATACGA	GTCA TACAGT
T1	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	-TAGTTAG -T	TGGAA TACGA	GTCA TA -AGT
T2	GATAAT--AT	CTACGCCTTG	GTAGTCGGGT	TGGAA TATGA	ATCTTA -GA -
E1	GATAATGTAT	CTACGCCTTG	-TAGTCAAGT	CGGAATACGA	GTCA TATA - -
E2	GATGATGTAT	CAACGCCTTG	-TAGTCAACT	CGGAATACGA	GTCA TATA - -

	555	565	575	585	595
B1	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	AGTCTGGCCTT	AGGATTGGTT	TGGAAGGT -G
B2	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	AGTCTGGCCTT	AGGATTGGTT	TGGAAGGT -G
O1	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	AGTCTGGCCTT	AGGATCGGTT	TGGAAGGT -G
O2	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	AGTCTGGCCTT	AGGATCGGTT	TGGAAGGT -G
O3	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	AGTCTGGCCTT	AGGATCGGTT	TGGAAGGT -G
C1	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAAGGT -G
C2	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAAGGT -G
G1	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAGGTT -G
G2	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAAGGT -G
M1	GTTAAGTGGT	AAG - - - - -G	AAACTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAGGGTTCG
M2	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGAA TCGGTT	TGGAAGGT -G
T1	GGTAAC TAAT	CAGGCTTTTCG	GGTCTGGCCTT	AGGATCGGTC	TGGAGGGTAG
T2	-GTGG -TAAG	GAAACTG - - -	GGTCTGGCCTT	AGGATCGGTT	TGGAGGGTTG
E1	- -TA - -TAAT	- -AACT - - - -	- - -CTGGCCTT	AGCATTGGTT	TGGAAGGT -G
E2	- -TA - -TAAT	- -AACT - - - -	- - -CTGGCCTT	AGCATTGGTT	TGGAAGGT -G

	605	615	625	635	645
B1	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
B2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
O1	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
O2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
O3	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
C1	CTTAACGAGC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
C2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
G1	CT-AACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
G2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
M1	CTTAACG-GC	TCCTTTTACT	TTCTCCCTTT	GTTGGAGATA	CTTGTCCGAT
M2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTT	GC-GGAGATA	CTTGTCCGAT
T1	CTTAGCG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTCCCTTA	GTTGAAGATA	CTTGTCCGAT
T2	CTTAACG-GC	TCCTTTTACT	TTCTCCCTTT	GTTGGAGATA	CTTGTCCGAT
E1	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTTCCTTA	GA-GAAGATA	CTTGTCCGAT
E2	CTTAACG-GC	TCCTTCTGCT	TTCTTCCTTA	GA-GGAGATA	CTTGTCCGAT

	655	665	675	685	695
B1	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
B2	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
O1	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
O2	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
O3	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
C1	TTTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
C2	TTTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
G1	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
G2	TCTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
M1	TGTAAGAGAG	GAATAGCTTA	GCGCCAGCTT	A-GCTTTCCT	TGAGTTTCTT
M2	TTTAAGAGAG	GAGTTGCTTA	GCGCGAGCTT	A-GCTTTCCT	TGATTTTT--
T1	GCTTAGAGAG	GAAAAGCTTA	G-GTAAGCTT	AAGCTTTCCA	AGAGTTTCTT
T2	TGTAAGAGAG	GAAAAGCTTA	GCGTAAGCTT	A-GCTTTCCT	AGAGTTTCTT
E1	ACTAAGTAAG	AGAGGG---A	GTT---GCTT	AGGCTTTTCT	TGA-----
E2	GCTAAGTAAG	AGAGGG---A	GTT---GCTT	AGGCTTTTCT	TGA-----

	705	715	725	735	745
B1	----CCC-TT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
B2	----CCC-TT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
O1	----CCCCTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
O2	----CCCCTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
O3	----CCCCTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
C1	----CCCTTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
C2	----CCCTTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
G1	----CCCTTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
G2	----CCCTTT	GACTCTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
M1	----CCGCTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
M2	----CCCTTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
T1	GTTACC-C TT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
T2	GTTACC GCTT	GACTTTGTAG	AAGGATTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
E1	-TTA----TC	GACTTTGTAG	AAGGGTTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT
E2	-TTA----TC	GACTTTGTAG	AAGGGTTCAG	CTTCTAACCG	TCCAATTGACT

	755	765	775	
B1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
B2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
O1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
O2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
O3	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
C1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
C2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
G1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
G2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
M1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
M2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
T1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
T2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCGCAAA	TC
E1	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC
E2	TGGACAATTT	ATTGACTATT	TGACCTCAAA	TC

Fig. 2

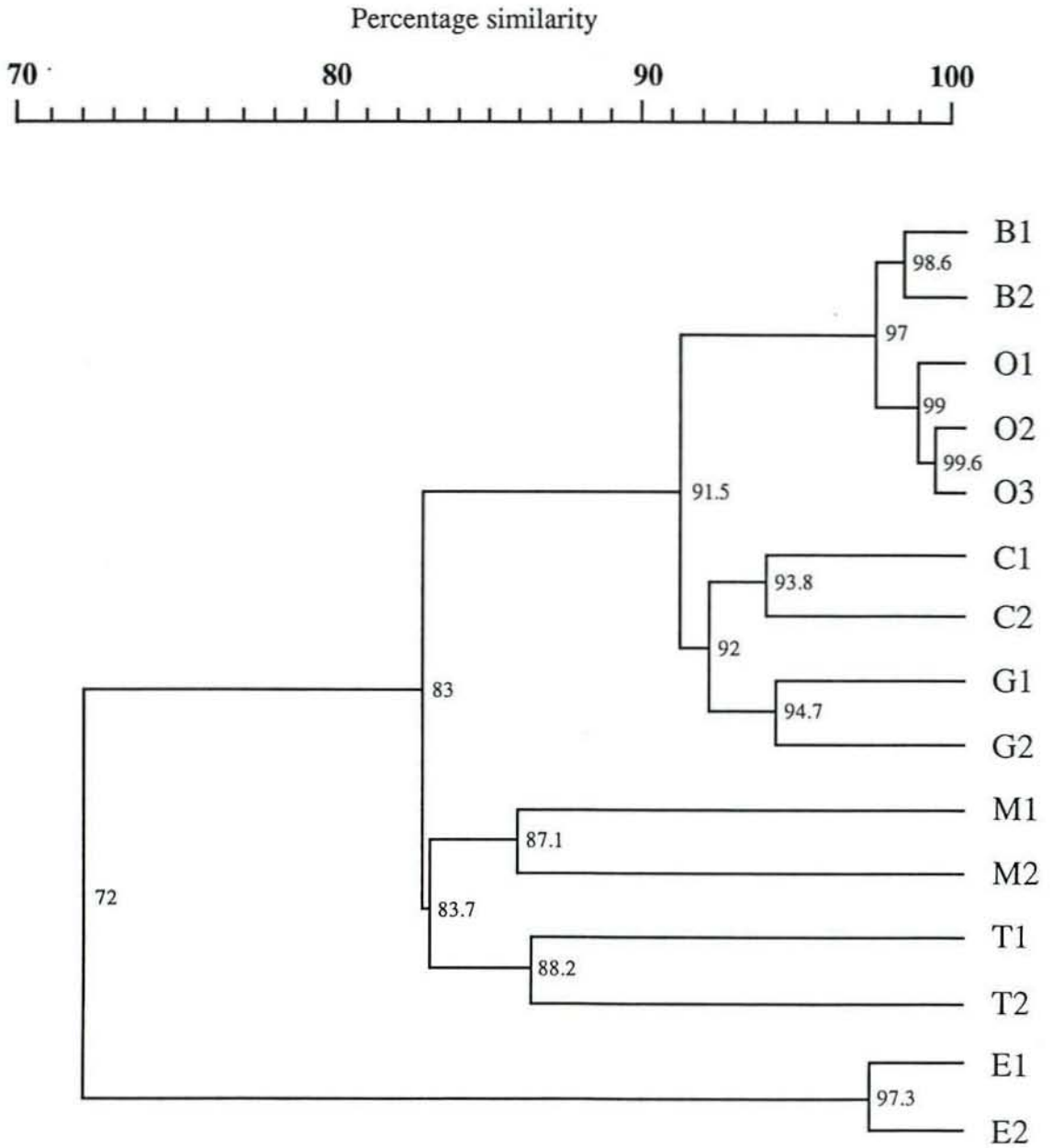


Fig. 3.

0.0066

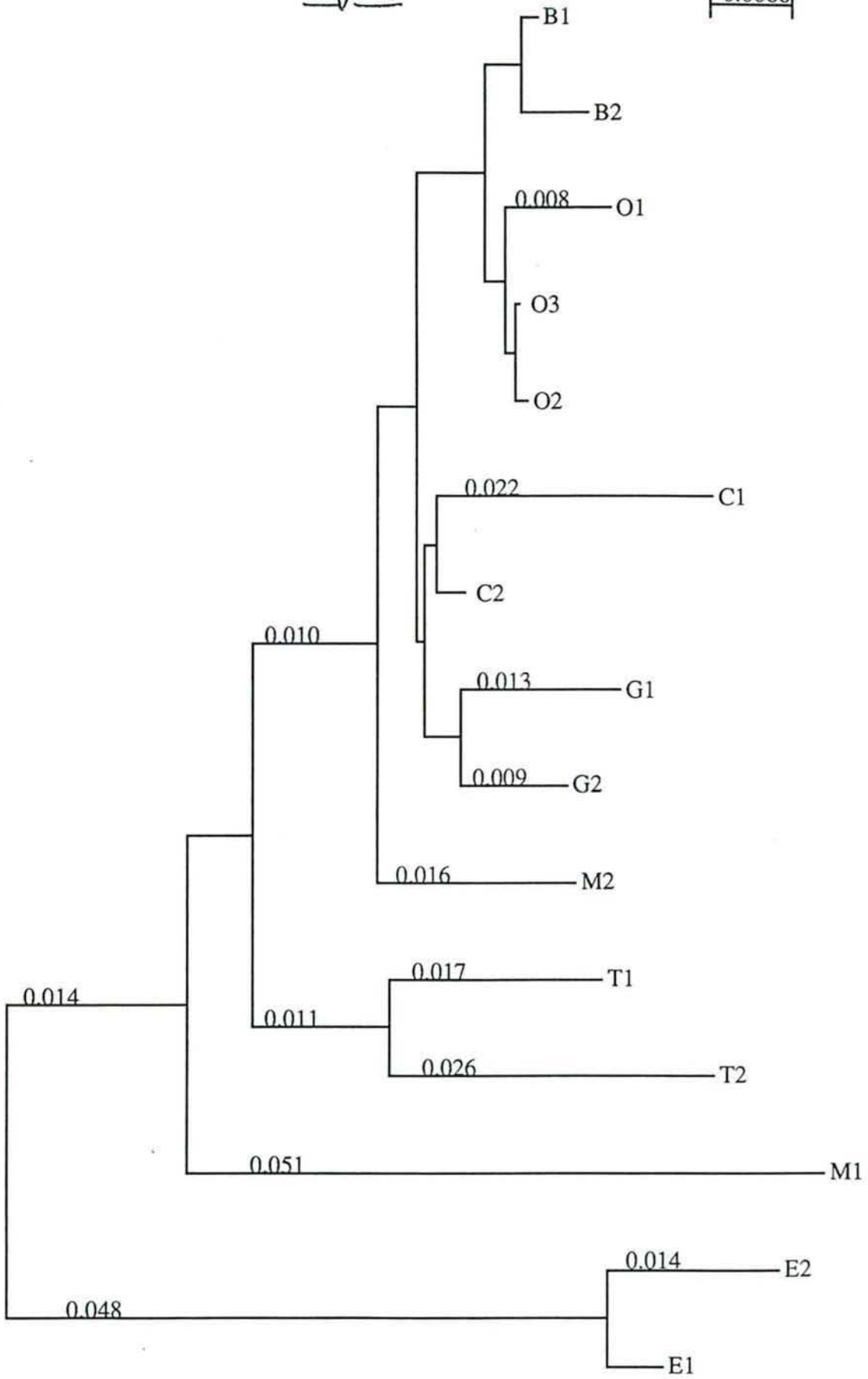


Table 1. Designation, geographical origins and gene bank accession numbers of the studied European *Armillaria* isolates. The names between brackets are those in Guillaumin's collection.

Isolates	Species	Origin	Year of isolation	Host plant	GenBank number
B1 (PA 80-20)	<i>A. borealis</i>	Attara, Finland	1979	Larch (<i>Larix sibirica</i>)	U54808
B2 (PA 84-5)	<i>A. borealis</i>	Eppe-sauvage forest, Northern France	1984	Birch (<i>Betula verrucosa</i>)	U54809
O1 (Salles)	<i>A. ostoyae</i>	Salles (Gironde), South-western France	1988	Maritime Pine (<i>Pinus pinaster</i>)	U54813
O2 (Le Porge)	<i>A. ostoyae</i>	Le Porge (Gironde), South-western France	1986	Maritime Pine (<i>Pinus pinaster</i>)	U54815
O3 (Nuedb)	<i>A. ostoyae</i>	La Teste (Gironde), South-western France	1983	Gorse bush (<i>Ulex nana</i>)	U54816
C1 (PB 71-1)	<i>A. cepistipes</i>	Saint-Victor-Montvianeix, (Puy de Dôme), France	1971	Lime tree (<i>Tilia platyphyllos</i>)	U54810
C2 (PB 75-6)	<i>A. cepistipes</i>	Saint-Genès-Champanelle, (Puy de Dôme), France	1979	Spruce (<i>Picea abies</i>)	U54811
G1 (PE 73-16)	<i>A. gallica</i>	Amance forest, (Meurthe & Moselle) Eastern France	1973	Fir tree (<i>Abies grandis</i>)	U54814
G2 (PE 80-31)	<i>A. gallica</i>	Tronçais forest (Allier), Central France	1978	Oak (<i>Quercus robur</i>)	U54812
M1 (PD 69-2)	<i>A. mellea</i>	Pont Saint Esprit, (Hérault), Southern France	1969	Peach tree (<i>Prunus persicae</i>)	U54817
M2 (Tcy)	<i>A. mellea</i>	Ychoux (Landes), South-western France	1975	Oak (<i>Quercus robur</i>)	U54818
T1 (PT 83-39)	<i>A. tabescens</i>	L'Isle-en-Dodon (Haute-Garonne), South-western France	1983	Eucalypt (<i>Eucalyptus dalrympleana</i>)	U54821
T2 (PT 89-85)	<i>A. tabescens</i>	Sicily, Italy	1989	Unknown	U54822
E1 (PY 83-16)	<i>A. ectypa</i>	Beyssac (Haute-Loire), Central France	1983	isolated from peat bog	U54819
E2 (MY 84-94-1)	<i>A. ectypa</i>	Mumaner Moor, South Eastern Germany	1979	isolated from peat bog	U54820

Isolates B1 and E2 have been isolated by Dr. K. Korhonen, B2 by Pr. A. Tirro (University of Catania), O1, O2, O3 and M2 by B. Lung-Escarmant, C1, C2, G1, G2, M1, T1 and E1 by J. J. Guillaumin.

Annexe 5: La surprise du chef

Morilles à la crème

Préparation: 15 minutes

Cuisson: 1 H 3/4

Pour 4 Personnes:

- 600 g de morilles
- 1 gousse d'ail
- 1 bouquet garni
- 1 petit pot de crème fraîche, 50 g de beurre, quelques tranches de pain rassis, sel, poivre.

Réalisation: Après les avoir bien nettoyées, mettez les morilles dans une sauteuse avec un peu d'eau, faites-les cuire quelques instants puis jetez l'eau de cuisson. Salez, poivrez, ajoutez le bouquet garni, la gousse d'ail hachée et le beurre. Couvrez et faites cuire une heure trois quarts à feu doux. Ajoutez la crème fraîche quelques minutes seulement avant la fin de la cuisson. Goûtez et rectifiez l'assaisonnement si nécessaire. Accompagnez de quelques croûtons de pains frits au beurre.



Ne consommez jamais de morilles crues (elles peuvent provoquer des accidents plus ou moins graves), et rejetez celles qui sont trop mûres (coriaces et indigestes). Nettoyez les soigneusement en surveillant particulièrement leurs alvéoles qui peuvent renfermer du sable et toutes sortes d'insectes. Le mieux est de les faire tremper dans de l'eau salée.

Délice de Bresse

Préparation: 15 minutes

Cuisson: 20 minutes

Pour 4 Personnes:

- un fond de tarte en pâte feuilletée
- 400 g de poulet cuit (1/2 poulet roti)
- 1 sachet de morilles séchées
- 1 petit pot de crème fraîche
- 3 oeufs
- 50 g de beurre, sel, poivre, 1 petit verre de marc.

Réalisation: Faites cuire à blanc le fond de tarte et réservez-le.

Mettez les morilles à gonfler dans de l'eau froide, essuyez-les lorsqu'elles ont bien repris leur forme. Découpez la chair du poulet en morceaux. Faites chauffer le beurre dans une sauteuse et faites-y doucement revenir morilles et poulet.

A ce moment vous pouvez, si vous le désirez, arroser d'un peu de marc et flamber.

Placez le tout sur le fond de tarte et nappez du mélange jaunes d'oeufs battus dans la crème, préalablement salé et poivré.

Mettez 20 minutes à four chaud (thermostat 8).

Nom: WIPF
Prénom: Daniel



DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY-I
en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 13 NOV 1997 n° 101

Le Président de l'Université



Les morilles présentent une grande diversité de formes, difficiles à interpréter même pour les spécialistes. Ceci a engendré un grand nombre de classifications différentes. Par ailleurs, ces champignons présentent une grande variabilité de modes de vie, qui semblent fortement influencés par des facteurs micro-écologiques.

Nous avons développé un outil moléculaire basé sur le polymorphisme de l'ADN ribosomal qui permet à la fois de clarifier la systématique ambiguë des morchellacées et une approche plus précise de leur écologie.

Une étude préalable du polymorphisme isoenzymatique a montré que celui-ci permet la séparation précise des souches y compris au sein d'une espèce, sans toutefois rendre compte des relations phylogénétiques.

L'analyse par PCR/RFLP de l'espaceur interne transcrit de l'ADNr a permis la distinction de trois groupes d'espèces avec des longueurs de l'ITS qui varient entre 740 et 1230 pb; le séquençage de cette région a autorisé une analyse de la phylogénie des morchellacées. Les distances phylogénétiques observées entre les groupes d'espèces au sein du genre *Morchella* sont comparables voire supérieures à celles avec les genres voisins. Ceci suggère que de même que les fausses morilles *Mitrophora* et *Verpa* ont été exclues du genre *Morchella* au siècle dernier il paraîtrait justifié de scinder les vraies morilles en deux voire trois genres. L'analyse de la région ITS permet également de mettre en cause la valeur de certaines espèces de morille telle que *M. vulgaris*.

L'étude sur le terrain des associations avec des plantes a confirmé la double aptitude des morilles à la symbiose et au parasitisme. L'étude en conditions contrôlées a apporté une confirmation expérimentale de la spécificité de *M. elata* pour *Pinus banksiana*, qui avait été décrite sur le terrain. La possibilité d'une association *M. esculenta*-*Betula pendula* a en outre été démontrée. L'étude expérimentale a également renforcé l'hypothèse du caractère crucial de l'association des morilles à des plantes supérieures lorsqu'elle se développent dans un contexte écologique difficile.

Mots-clés: biologie moléculaire, écologie, isoenzymologie, *Morchellaceae*, morille.

