



De l'individu à l'espèce : structure génétique multi-échelles des populations du Basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria amethystina*

Lucie Vincenot

► To cite this version:

Lucie Vincenot. De l'individu à l'espèce : structure génétique multi-échelles des populations du Basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria amethystina*. Systématique, phylogénie et taxonomie. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2009. Français. NNT : . tel-02181028

HAL Id: tel-02181028

<https://hal.science/tel-02181028>

Submitted on 11 Jul 2019

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

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

N°attribué par la bibliothèque : |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Thèse pour l'obtention du diplôme de

Doctorat de l'Université Montpellier II

Discipline : Biologie et Écologie des Populations

École Doctorale : SIBAGHE

Présentée par

Lucie VINCENOT

DE L'INDIVIDU À L'ESPÈCE : STRUCTURE GÉNÉTIQUE
MULTI-ÉCHELLES DES POPULATIONS DU BASIDIOMYCÈTE
ECTOMYCORHIZIEN *LACCARIA AMETHYSTINA*

Présentée et soutenue publiquement le 4 décembre 2009

Membres du jury :

Claire NEEMA, Professeur à AgroParisTech

Rapporteur

Roland MARMEISSE, Chargé de Recherches à l'Université Lyon I

Rapporteur

Joëlle RONFORT, Directrice de Recherches à l'INRA de Mauguio

Examineur

Hervé GRYTA, Maître de conférences à l'Université Toulouse III

Examineur

Daniel MOUSAIN, Directeur de Recherches à l'INRA - Montpellier SupAgro

Examineur

Marc-André SELOSSE, Professeur à l'Université Montpellier II

Directeur

De l'individu à l'espèce : structure génétique multi-échelles des populations du Basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria amethystina*

Résumé :

Les champignons ectomycorhiziens sont des symbiotes de la plupart des espèces d'arbres des forêts partout dans le monde, favorisant leur développement en leur apportant des nutriments du sol. Malgré leur importance écologique, les populations de ces espèces (généralement Basidiomycètes ou Ascomycètes) restent peu étudiées. Mes travaux de thèse s'intéressent à la génétique des populations du modèle *Laccaria amethystina*, Basidiomycète ectomycorhizien symbiote d'une gamme variée d'hôtes de forêts tempérées d'Europe et d'Asie, à des échelles spatiales variées. Au niveau local, un dispositif de suivi pluriannuel de populations a été mis en place, afin d'en décrire la dynamique spatio-temporelle et de comprendre la stratégie écologique de cette espèce. À des échelles plus larges, j'ai étudié la structure génétique spatiale des populations de *L. amethystina* en France (450 km), puis en Europe (2900 km) et de l'Europe à l'Asie (10000 km) pour en comprendre la biogéographie. Ces travaux ont révélé une population européenne panmictique, en partie due à la dispersion à grande distance des spores de reproduction sexuée, et un potentiel phénomène de spéciation cryptique au sein de *L. amethystina* entre l'Europe et le Japon. Ces résultats ouvrent la voie à des recherches ultérieures sur la structure génétique spatiale et temporelle des populations du genre modèle ectomycorhizien *Laccaria* spp.

Mots-clés : Ectomycorhize, génét, flux de gènes, isolement par la distance, phylogéographie, spéciation cryptique

From individual to species: multi-scales population genetic structure of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina*

Abstract:

Ectomycorrhizal fungi are symbiotic with most of forest tree species worldwide, and enhance their development by bringing them nutrients from the soil. Despite their major ecological role, populations of these species (mostly Basidiomycetes and Ascomycetes) remain poorly studied. My PhD work focuses on population genetics of the model ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina*, symbiont of a large panel of host trees from European and Asian temperate forests, at various spatial scales. At the local resolution, a pluriannual survey of populations has been launched to describe their spatio-temporal dynamic and understand the ecological strategy of the species. At larger scales, I studied the spatial genetic structure of *L. amethystina* populations in France (450 km), then in Europe (2900 km) and from Europe to Asia (10000 km) to understand their biogeography. These works revealed a single, panmictic European population, partly due to long-distance dispersal of sexual spores, and a putative cryptic speciation phenomenon within *L. amethystina* between Europe and Japan. These results pave the way to further investigations on spatial and temporal genetic structure of the populations of the model ectomycorrhizal genus *Laccaria* spp.

Keywords: Ectomycorrhiza, genet, gene flow, isolation by distance, phylogeography, cryptic speciation

Remerciements

Cette thèse a été financée par une allocation du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. Elle a été préparée au sein de l'équipe Interactions Biotiques du Centre d'Écologie Fonctionnelle et Évolutive (CEFE), UMR 5175 (CNRS, 1919 route de Mende F-34293 MONTPELLIER Cedex 5).

Je souhaite remercier chaudement les équipes du Service des Marqueurs Génétiques du CEFE et de l'équipe Interactions Arbres-Microorganismes (UMR1136) de l'INRA de Champenoux pour leur accueil, leurs conseils et leur soutien dans mon travail de biologie moléculaire, ainsi que l'équipe du Terrain d'Expérimentation du CEFE pour leurs conseils avisés pour partir échantillonner dans les Cévennes.

Un grand merci également aux divers mycologues, chercheurs ou simplement passionnés, que j'ai rencontré au cours de ces 3 années de thèse, ainsi qu'aux échantillonneurs européens qui m'ont très aimablement aidée dans la collecte de laccaires. Cette thèse n'aurait tout simplement pas été possible sans eux.

Je remercie aussi mes collègues, co-auteurs et collaborateurs scientifiques du CEFE, de l'Université Montpellier II, des INRA de Champenoux et de Montpellier, et d'ailleurs... parfois beaucoup plus loin ! Merci à eux pour leurs conseils, leurs idées, leurs connaissances et leurs points de vue, pas toujours restreints à la mycologie ou à la génétique des populations. Merci en particulier aux collègues que j'ai côtoyé trois années et qui m'ont épaulé dans mes travaux de thèse et leur rédaction, et à mon directeur de thèse Marc-André Selosse.

Enfin, j'aimerais remercier les membres du jury de ma thèse et de mes comités de thèse, pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux, leur lecture et leurs conseils.

Table des matières

CHAPITRE I : APPLIQUER LA GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS AUX CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS	8
I.1. INTRODUCTION : NAISSANCE DES CONCEPTS DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS	9
I.2. APPLICATIONS DES CONCEPTS DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS.....	13
I.2.1. À l'origine, des développements théoriques et empiriques successifs	13
I.2.2. Utiliser les outils de génétique des populations pour comprendre la diversité des populations naturelles .	18
I.2.3. Structure génétique spatiale et approche biogéographique	21
I.3. GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS.....	26
I.3.1. Diversité biologique et fonctionnelle des champignons ectomycorhiziens.....	26
I.3.2. Application de la génétique des populations aux espèces ectomycorhiziennes	36
CHAPITRE II : LE GENRE <i>LACCARIA</i> COMME MODÈLE D'ÉTUDE DES POPULATIONS DE CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS	83
II.1. BRÈVE DESCRIPTION DE LA BIOLOGIE DE L'ESPÈCE.....	84
II.2. LE GENRE <i>LACCARIA</i> EN LABORATOIRE, UN MODÈLE DE BIOLOGIE ECTOMYCORHIZIENNE	87
II.2.1. Première période : <i>Laccaria</i> comme modèle biologique ectomycorhizien	87
II.2.2. Deuxième période : 1980 – 1990, les mycorhizations contrôlées	88
II.2.3. Troisième période : étude in vitro des mécanismes et de l'interaction ectomycorhizienne	91
II.2.4. Les années 2000 : l'ère de la génomique	93
II.3. <i>LACCARIA BICOLOR</i> ET <i>L. AMETHYSTINA</i> , ESPÈCES MODELES DE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS ECTOMYCORHIZIENNES.....	95
CHAPITRE III : DES POPULATIONS LOCALES À L'AIRE DE RÉPARTITION GLOBALE	125
III.1. ESTIMER LES FLUX DE GÈNES POUR COMPRENDRE LES INTERACTIONS ENTRE LES POPULATIONS.....	126
III.2. LES POPULATIONS DE <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> À L'ÉCHELLE FRANÇAISE.....	131
III.3. STRUCTURE GÉNÉTIQUE DES POPULATIONS DE <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> À L'ÉCHELLE DE LEUR AIRE DE REPARTITION.....	147
CHAPITRE IV	189
IV.1. STRUCTURE DES POPULATIONS DE <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> ET VARIABILITÉ ENVIRONNEMENTALE.....	190
IV.1.1. Adaptations des populations de <i>L. amethystina</i> aux variations environnementales	192
IV.1.3. Adaptations des populations et flux géniques	194

IV.2. <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> , UNE ESPÈCE EURASIATIQUE OU UNE SPÉCIATION CRYPTIQUE ENTRE EUROPE ET ASIE ?	194
IV.2.1. <i>Délimitation des espèces fongiques</i>	194
IV.2.2. <i>Hypothèse de spéciation cryptique transcontinentale chez L. amethystina</i>	196
IV.3. COMPLÉMENTARITÉ DES ÉTUDES DE POPULATIONS DE <i>LACCARIA AMETHYSTINA</i> , DU SUIVI LOCAL À L'ÉCHELLE CONTINENTALE	199
IV.3.1. <i>Régimes de reproduction</i>	200
IV.3.2. <i>Flux géniques entre les populations et dispersion</i>	201
IV.4.1. <i>Disponibilité de marqueurs moléculaires</i>	204
IV.4.2. <i>Prolonger les suivis spatio-temporels locaux</i>	205
IV.4.3. <i>Préciser la biogéographie de L. amethystina sur le continent eurasiatique</i>	206
IV.4.4. <i>Élargir l'approche biogéographique au genre Laccaria dans l'Hémisphère Nord</i>	207
CONCLUSION	209
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	211
ANNEXE : COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	227

Tables des figures, tableaux et encadrés

Figure 1 : <i>Processus évolutifs modelant la structure génétique des populations</i>	12
Figure 2 : <i>Anatomie des différents types morphologiques de mycorhizes</i>	28
Figure 3 : <i>Cycle biologique d'un champignon basidiomycète ectomycorhizien</i>	30
Figure 4 : <i>Interactions des champignons ectomycorhiziens dans l'écosystème forestier</i>	34
Figure 5 : <i>Spatialisation des principales études de dynamiques de populations locales ectomycorhiziennes</i>	40
Figure 6 : <i>Macro- et micro-morphologie d'espèces communes de Laccaria spp.</i>	85
Figure 7 : <i>Carpophores de Laccaria bicolor S238N associé à des plantules de Pseudotsuga menziesii</i>	89
Figure 8 : <i>Placettes de suivis de fructification dans le Bois de Miquel</i>	103
Figure 9 : <i>Cartographie des génets en 2007 et 2008 sur les placettes 1</i>	108
Figure 10 : <i>Stratégies écologiques de L. amethystina</i>	117

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations	17
Tableau 2 : Richesses alléliques au sein des populations locales de <i>L. amethystina</i>	106
Tableau 3 : Estimateurs du régime de reproduction des populations locales de <i>L. amethystina</i>	106
Tableau 4 : Diversité locale et description des génets de <i>L. amethystina</i> en 2007 et 2008	107
Tableau 5 : Indices de différenciation génétique (F_{ST}) entre paires de populations.	109
Tableau 6 : Principales caractéristiques écologiques d'espèces ectomycorhiziennes étudiées pour la dynamique locale de leurs populations	121
Tableau 7 : Principales caractéristiques de structure géographique spatiale entre populations de champignons ectomycorhiziens	129
Tableau 8 : Différences au sein de <i>L. amethystina</i> entre Europe et Asie	197
Tableau 9 : Apports complémentaires des différents niveaux d'étude sur les processus modelant les populations de <i>L. amethystina</i>	203
 Encadré 1 : Glossaire de génétique des populations	 12
Encadré 2 : Éléments de biologie et de génétique des champignons ectomycorhiziens	31
Encadré 3 : Taille des génets de champignons ectomycorhiziens	99

CHAPITRE I

Appliquer la génétique des populations aux champignons ectomycorhiziens

I.1. Introduction : naissance des concepts de génétique des populations

Il existe de nombreuses approches complémentaires pour s'intéresser à la biologie d'un organisme en particulier, allant de l'étude des structures moléculaires du vivant, aux approches physiologiques et anatomiques pour comprendre les fonctions vitales d'un individu, ou encore l'étude des cycles biologiques et des mécanismes de transmission de l'information génétique. Cependant, un organisme biologique ne vit jamais isolé naturellement, mais interagit et se reproduit avec d'autres individus de son espèce, avec qui il forme une **population** (Encadré 1). La composition génétique de ces populations est variable, et leur diversité, parfois observable à l'œil nu, soulève des questions auxquelles l'étude de la biologie des organismes seule ne peut pas répondre. L'étude de la composition génétique des populations et des facteurs influençant leurs changements relève du domaine de la **génétique des populations**.

La composition génétique d'une population, ou **structure génétique** (Encadré 1), est une collection de fréquences de différents génotypes, ou de fréquences d'**allèles** à différents loci. Ces fréquences résultent de processus évolutifs et démographiques faisant fluctuer le nombre d'individus de chaque génotype au sein de la population. Pour comprendre comment l'identité génétique (le **génotype**) d'un individu participe à la création de la diversité génétique de sa population, la génétique des populations explore différents processus touchant chaque individu en particulier, en l'intégrant dans sa population. La variation génétique et le niveau de diversité au sein d'une population sont en effet affectés par de nombreux facteurs. Le patrimoine génétique de l'individu résulte de mécanismes évolutifs (**mutation**, **recombinaison** ; Encadré 1) qui créent le **polymorphisme** des génotypes au sein de la population. Cette variabilité est affectée par des processus généraux intra- et inter-populationnels, comme la **sélection naturelle**, les **régimes de reproduction** (autogamie/allogamie ; Encadré 1) et les **migrations** (Encadré 1). La variabilité des populations est aussi touchée par des processus stochastiques, tels que les fluctuations aléatoires des fréquences génotypiques, générant la **dérive génétique** (Encadré 1), ou des phénomènes stochastiques externes (pouvant provoquer des **goulots d'étranglement**) (Encadré 1, Figure 1).

Encadré 1 : Glossaire de génétique des populations

Analyse de parenté : assignement statistique de parents présumés à un individu donné, basé sur la compatibilité génétique entre les parents candidats et les individus de la génération suivante

Biologie moléculaire : techniques de manipulation des acides nucléiques ; ensemble des disciplines visant à comprendre le fonctionnement moléculaire des organismes en utilisant ces techniques

Coefficient de consanguinité F_{IS} : part de la variance d'une population due à la variabilité individuelle ; la valeur du F_{IS} estime l'importance de l'autofécondation au sein d'une population

Dérive génétique : perte aléatoire d'allèles, réduisant l'hétérozygotie d'une population. C'est une des forces majeures d'évolution des populations ; la sensibilité des populations à la dérive génétique dépend de leur taille efficace : une population de taille infinie (une des conditions de l'équilibre de Hardy-Weinberg) ne subit pas la dérive génétique, tandis que dans une population de petite taille la dérive peut mener à la fixation d'un allèle, c'est-à-dire la perte de polymorphisme à un locus

Déséquilibre de liaison : association non aléatoire des allèles entre plusieurs loci. Il en résulte que les combinaisons d'allèles au sein d'une population ne suivent pas celles attendues dans le cas d'une formation au hasard des haplotypes selon les fréquences alléliques

Dépression de consanguinité : baisse de la valeur sélective moyenne d'une population due au croisement d'individus apparentés ; plus la consanguinité est grande, plus les individus sont homozygotes pour de nombreux loci, ce qui favorise l'expression d'allèles récessifs désavantageux

Différenciation génétique des populations F_{ST} : part de la variance d'une population due à la variabilité d'une sous-population ; un F_{ST} élevé (proche de 1) indique une forte différenciation entre les sous-populations et peu de migration entre elle ; exprimée par $F_{ST}=1/(1+4N_m)$, N_m étant le nombre de migrants (Wright 1969)

Équilibre de Hardy-Weinberg : dans une population (i) panmictique (association aléatoire des gamètes pour les gènes considérés), (ii) de taille infinie, et (iii) où la fréquence des gènes n'est pas soumise à une pression évolutive (mutation, sélection, migration), équilibre des fréquences alléliques et génotypiques ; la détection d'un écart à cette loi dans une population naturelle permet souvent d'extraire des informations sur son régime de reproduction

Flux géniques : mouvements de gènes d'une population à l'autre, augmentant ou maintenant leur similarité ; ces flux sont principalement dus à la migration et à la dispersion des gamètes

Génétique écologique : étude de la génétique, en particulier des traits de valeur sélective, dans un contexte d'interactions entre organismes d'une population naturelle et avec leur environnement

Génétique du paysage : combinaison de la génétique des populations et de l'écologie du paysage, visant à décrire les interactions entre les caractéristiques du paysage et les processus évolutifs des populations, et comprendre finement la structure génétique des populations dans l'espace

Génotype : ensemble d'allèles aux différents loci considérés chez un individu

Goulot d'étranglement : réduction drastique de la taille efficace d'une population (due par exemple à un effondrement démographique) ; elle peut causer une perte de polymorphisme au sein de la population, par perte directe d'allèles lors de la réduction et en accroissant sa sensibilité à la dérive génétique

Isolement par la distance : accroissement de la différenciation génétique entre populations selon un gradient de distance ; la distance limite d'isolement peut permettre d'estimer la taille du voisinage génétique d'une population

Marqueur moléculaire : caractère moléculaire utilisé comme indicateur de la variabilité génétique des individus au sein d'une population ou entre taxons

Migration : mouvement d'individus entre populations, c'est une des forces majeures d'évolution des populations

Mutation : changement d'état de caractère, c'est une des forces majeures d'évolution des populations ; nucléotidique, elle peut être synonyme (silencieuse) ou non synonyme, selon qu'elle induit ou non une modification de la séquence polypeptidique codée par le gène muté

Polymorphisme : existence de plusieurs allèles pour un même locus au sein d'une population ; un locus est généralement considéré comme polymorphe si la fréquence de son allèle majoritaire n'excède pas 95%

Population : ensemble d'individus d'une même espèce, se reproduisant sur un territoire donné

Recombinaison : échange de gènes ou de segments de gènes par *crossing over* entre des chromatides ; sa probabilité s'accroît avec la distance physique entre deux loci ; elle est utilisée pour cartographier les génomes

Régime de reproduction : manière dont les gamètes s'assemblent au sein de la population pour former la génération suivante ; par exemple : panmixie (union des gamètes au hasard), autogamie (chaque individu se reproduit par autofécondation), consanguinité (union entre individus apparentés)

Structure génétique : collection des fréquences alléliques au sein d'une population

Structure génétique spatiale : organisation dans l'espace de la structure génétique selon la situation géographique des individus ou des sous-populations entre elles

Taille efficace : nombre d'individus participant aux processus reproductifs à un moment donné dans une population

Voisinage génétique : surface au sein de laquelle une population peut être considérée comme panmictique ; la taille de voisinage génétique est le nombre d'individus pouvant se reproduire entre eux dans l'aire de voisinage

Processus individuels :

mutation
recombinaison



ADN

Individu

Processus intra-population :
régime de reproduction
sélection naturelle
dérive génétique

Population

Processus inter-populations :
migration

Figure 1 : Processus évolutifs modelant la structure génétique des populations. L'environnement des populations influe sur tous les niveaux de processus.

I.2. Applications des concepts de génétique des populations

La génétique des populations est une discipline jeune, née au début du XX^{ème} siècle de la synthèse d'approches théoriques indépendantes, et qui s'est développée par les apports successifs de résultats empiriques et de l'émergence de développements théoriques associés. Cette science a la particularité d'avoir d'abord été élaborée et valorisée comme une discipline théorique, avant que des recherches empiriques ne lui confèrent une importance significative (Hedrick 2005).

I.2.1. À l'origine, des développements théoriques et empiriques successifs

Développements théoriques

L'**approche théorique** de la génétique des populations, tend, initialement, à construire des **modèles** théoriques généraux pour répondre aux questions soulevées par des observations empiriques. Les modèles théoriques sont également élaborés pour fournir un cadre général, dans lequel sont généralisés des patrons observés dans différentes populations en une base conceptuelle pour comprendre l'impact de différentes forces évolutives sur la structure génétique des populations (Griffiths *et al.* 2008). Les modèles de génétique évolutive sont indissociables des études empiriques ou expérimentales pour l'émergence de nouveaux concepts, et pour le développement d'outils d'analyse statistique et bioinformatique permettant la compréhension des patrons génétiques observés. Mais leur défaut inhérent est qu'ils reposent souvent sur des prérequis très précis, parfois très peu connectés aux réalités biologiques. Slatkin et Veuille (2002) considèrent même qu'« une [...] caractéristique de la génétique des populations modernes est l'élaboration d'études mathématiques séparées des études empiriques ».

Pourtant, la génétique des populations est effectivement née d'approches théoriques. Au début du XX^{ème} siècle, de Vries, von Tschermak et Correns redécouvrent indépendamment, par des expériences de génétique des plantes, les lois de Mendel sur l'hérédité. Cette redécouverte a permis à Hardy et Weinberg de formuler en 1908 le principe d'**équilibre** des fréquences alléliques et génotypiques au cours des générations (sous certaines conditions), qui sera la base de nombreux développements théoriques de génétique des populations, car il permet de

décrire la composition génétique de populations diploïdes en termes de fréquences alléliques et non génotypiques (Hedrick 2005 ; Encadré 1). En 1909, Johanssen propose le terme « **gène** » comme base de l'hérédité.

Les apports de scientifiques de différentes disciplines, intéressés par la biologie des populations et les processus génétiques qui y participent, contribueront à une synthèse théorique de la biologie évolutive. Fisher, Wright et Haldane sont considérés comme les fondateurs de la théorie de la génétique des populations. Dès 1918, Fisher applique des analyses statistiques à la génétique des populations pour calculer la distribution des fréquences génétiques au sein des populations ; il découvre le **déséquilibre de liaison** (Encadré 1), et initie l'utilisation des méthodes de maximum de vraisemblance en biostatistiques. Wright découvre le **coefficient de consanguinité** (F_{IS} ; Encadré 1) et l'applique aux populations en prenant en compte la dérive génétique, et Haldane s'intéresse particulièrement à la théorie mathématique de la sélection naturelle. Leurs travaux reposent sur les mécanismes de la génétique mendélienne, et ont fondé la théorie de la génétique des populations sur les fréquences géniques. Ces travaux sont prolongés, dès les années 1930, par les recherches de **génétique écologique** (Encadré 1) des entomologistes Ford et Dobzhansky et du botaniste Stebbins (qui s'intéressent notamment à la sélection dans les populations naturelles), les travaux de paléontologie de Simpson, et l'étude des processus de spéciation des ornithologues Rensch et Mayr, définissant le concept d'espèce biologique. À partir de ces nombreuses avancées dans domaines scientifiques distincts, Huxley propose en 1942 une **théorie synthétique de l'évolution** (ou théorie néo-darwinienne). Cette théorie fait concorder les processus de génétique mendélienne avec la sélection naturelle des phénotypes et l'évolution graduelle des espèces (Campbell et Reece 2004).

La théorie synthétique de l'évolution a prédominé jusque dans les années 1980, puis a été intégrée par Kimura (1987) dans sa **théorie neutraliste de l'évolution**. Cette théorie prend en compte l'existence de mutations nucléotidiques silencieuses : elles ne modifient pas la structure des protéines codées par le gène muté, ou bien sont situées dans des parties non codantes du génome, et ne sont donc pas soumises à la sélection naturelle (elles sont neutres). Les théories synthétique et neutraliste de l'évolution sont compatibles, mais la seconde ne considère plus la sélection naturelle comme le moteur principal de l'évolution, mais comme l'un des facteurs participant à l'évolution des populations, au même titre que des processus

stochastiques comme la dérive génétique. La théorie neutraliste de Kimura (1987) reste présentement un modèle, reposant sur des hypothèses rarement rencontrées dans les populations naturelles (constance du taux de mutation et de la taille des populations, équilibre entre mutation et dérive).

Les développements théoriques de la génétique des populations ont été rendus possibles par les synthèses successives des résultats de recherches empiriques, faisant émerger des modèles généralisables à d'autres populations ; les théories de la génétique des populations ont aussi pu être vérifiées et critiquées *a posteriori* par leur application à des populations naturelles.

Développements empiriques

L'**approche empirique** de la génétique des populations a pour objet de décrire la variation d'un ou de plusieurs gènes dans une population, souvent **naturelle** (*i.e.* spontanée, non créée par une activité humaine) ; cette description peut être liée à la mesure de facteurs environnementaux, pour tenter de comprendre leur influence sur la structure des populations (effets de la géographie, des paysages, adaptations au milieu local). Cette étape d'observation peut être complétée par une **approche expérimentale**, pour comprendre l'effet de facteurs particuliers sur les niveaux et les patrons de variation génétique. Des conditions environnementales peuvent être testées, mais il est aussi possible de manipuler des populations (l'un des premiers exemples historiques est celui des cages à drosophiles de Teissier et L'Héritier, 1934) et, aujourd'hui, de comparer l'évolution de séquences géniques de populations ayant connu des histoires démographiques ou des conditions environnementales différentes (Hedrick 2005). Ces expérimentations permettent de préciser des patrons de variation génétique entre individus d'une population artificielle, et d'en inférer les processus évolutifs (Griffiths *et al.* 2008). Si les approches empiriques et expérimentales ne sont pas à la base de la génétique des populations, elles ont permis, en fournissant des exemples biologiques concrets, de développer les modèles et de faire progresser les concepts de la discipline.

Pour étudier l'influence de divers processus modelant une population, il faut d'abord pouvoir quantifier la variation génétique au sein de la population et obtenir ainsi une image de sa structure génétique. Les démarches de quantification de la variabilité génétique au sein des

populations et entre populations sont apparues au cours des années 1930-1940, lorsque les théories de Darwin et de Mendel ont été regroupées en théorie synthétique de l'évolution. Les premières études portent sur des variations facilement détectables et/ou quantifiables, comme des traits morphologiques ou colorimétriques (Ford en 1940 définit le polymorphisme sur la morphologie de papillons), des inversions (Dobzhansky 1947) ou des multiplications chromosomiques (Stebbins 1940 sur la polyploïdie en botanique) ou le polymorphisme des groupes sanguins (Landsteiner et Wiener 1940). Des caractères d'intérêt agronomique, facilement mesurables, ont ensuite été utilisés comme estimateurs de la variabilité génétique par les sélectionneurs, et également par les évolutionnistes : les variations de rendement, la vitesse de croissance, la conformation du plant, les taux métaboliques, ou encore le comportement sont des différences évidentes entre variétés et espèces (Griffiths *et al.* 2008).

Cependant, la relation entre les **phénotypes** et les génotypes est complexe et plus ou moins évidente. Elle est affectée par de nombreux facteurs épigénétiques (les traits observés sont souvent régulés par plusieurs gènes) ou environnementaux ; de plus, la variation observée sur les caractères mesurés sous-estime largement la variation génétique totale des individus. Pour des analyses statistiques plus simples et moins biaisées, il devenait préférable de disposer d'outils estimant directement la variation allélique à différents loci au sein des populations. Pour cela, il fallait pouvoir accéder au locus chez l'individu : un gène en particulier, son produit, ou encore une séquence d'ADN de fonction non caractérisée.

En effet, les variations moléculaires observées grâce au développement de marqueurs de plus en plus puissants sont le plus souvent invisibles sur le phénotype de l'individu, et impossibles à estimer sans accès à l'information génétique. La découverte de la structure en double hélice de l'ADN en 1953 par Watson, Crick et Franklin a ouvert la voie à la **biologie moléculaire** (Encadré 1), et l'accès direct à l'information génétique. Les premières estimations moléculaires de la variation génétique des individus proviennent de la publication d'études basées sur des **allozymes** (Tableau 1) par Lewontin et Hubby (1966) chez la drosophile, et par Harris (1966) chez l'homme. Les avancées techniques majeures suivantes et la réduction des coûts techniques ont permis de développer des **marqueurs moléculaires** plus faciles à obtenir, plus nombreux et plus informatifs, et de les utiliser pour génotyper de plus grands nombres d'individus afin d'observer la diversité génétique des populations.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations

<i>Marqueur</i>	<i>Premières utilisations</i>	<i>Description</i>	<i>Locus dominants / codominants, neutres /sélectionnés</i>	<i>Polymorphisme</i>	<i>Reproductibilité</i>
Allozymes	1966	Formes variables d'une enzyme, codées par différents allèles à un même locus	Codominants, neutralité incertaine	Faible	Bonne
RFLP	1981	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> : digestion d'un fragment d'ADN par des enzymes de restriction	Codominants, neutres ou sélectionnés selon le locus choisi	Limité, selon les sites digérés par les enzymes	Bonne
SSCP	1989	<i>Single Strand Configuration Polymorphism</i> : révélation des différences de conformation de séquences de même longueur par les conditions d'électrophorèse	Distinction des allèles des 2 brins, locus neutres ou sélectionnés selon le locus choisi	Faible	Variable selon les conditions d'expérimentation
Minisatellites et microsatellites	1989	Répétitions en tandem de motifs nucléotidiques (10 à 100 pb pour les minisatellites, 1 à 10 pb pour les microsatellites)	Codominants et neutres <i>a priori</i>	Elevé	Bonne : amorces spécifiques au fragment à amplifier
AFLP	1990	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> : amplification de fragments digérés par des enzymes de restriction	Locus ciblés non choisis	Limité, selon les sites digérés par les enzymes	Bonne
RAPD	1991	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> : amplification aléatoire de fragments d'ADN non choisis	Locus ciblés non choisis	Faible	Variable selon les conditions d'expérimentation
SNP	1998	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> : polymorphisme nucléotidique ponctuel	Codominants, neutres ou sélectionnés selon le locus choisi	Faible (4 caractères nucléotidiques possibles)	Bonne : amorces spécifiques au fragment à amplifier, séquence connue

1.2.2. Utiliser les outils de génétique des populations pour comprendre la diversité des populations naturelles

Le développement de marqueurs permettant d'observer et de quantifier la diversité génétique des populations, et d'outils statistiques permettant d'interpréter ces données, a permis de comprendre certains mécanismes biologiques et processus modelant les populations et leur évolution.

Une particularité de l'étude des espèces par une approche de génétique des populations est que ces études ne portent pas sur la population entière, mais sur un échantillon statistiquement représentatif à partir duquel il est possible d'estimer les fréquences alléliques de la population globale. Cette approche permet de se détacher de la biologie de l'individu en particulier, mais de le considérer comme partie d'un ensemble de ressources génétiques (*pool génique*).

« The frequencies with which the different genotypes occur define the gene ratio characteristic of the population, so that it is often convenient to consider a natural population not so much as an aggregate of living individuals as an aggregate of gene ratios. » (Fisher 1943)

Les premières populations étudiées ont principalement été des populations artificielles de laboratoire créées à des fins de génétique expérimentale (*Neurospora*, *Drosophila*), et ont permis d'énoncer les concepts de la génétique des populations. Ils ont ensuite été largement appliqués, grâce aux avancées statistiques et biotechnologiques, à l'étude de l'écologie et de la biologie des populations naturelles ou partiellement artificielles qui composent la diversité biologique des écosystèmes.

Un des objectifs majeurs de la compréhension des mécanismes génétiques qui modèlent la structure des populations naturelles est la **conservation** de ces populations. La génétique des populations peut en effet être appliquée à la conservation des espèces en aidant à identifier les risques des populations en danger d'extinction, et en estimant les effectifs et les surfaces d'habitat requises pour leur protection (O'Brien 1994 ; Hedrick 2001). La compréhension de l'histoire évolutive et des faiblesses génétiques d'une population, associée aux connaissances sur sa biologie et son écologie, permet la mise au point de stratégies de conservation,

notamment pour les espèces en danger. Différentes approches ont par exemple été couplées pour comprendre l'écologie et la génétique des populations de *Shorea lumutensis*, une Diptérocarpacée rare et endémique de la péninsule malaise, pour définir les priorités dans les stratégies de sa conservation (Lee *et al.* 2006). En associant des suivis démographiques et phénologiques à la caractérisation de la structure génétique des populations de *S. lumutensis* par des marqueurs microsatellites, les auteurs ont pu proposer des mesures précises de gestion des populations de cette espèce, comme une taille de population minimale à maintenir, la délimitation d'une zone de conservation *in situ* judicieuse, un suivi régulier de la diversité génétique, ainsi que le nombre de graines à conserver *ex situ*.

Les populations de petite taille ayant subi un **goulot d'étranglement** sont une des préoccupations majeures des généticiens de la conservation. En effet, leur faible variabilité génétique due à la perte d'allèles par dérive génétique, et de là, une tendance à l'homozygotie rend ces populations plus vulnérables à la stochasticité environnementale, et sujettes à la **dépression de consanguinité** (Encadré 1 ; O'Brien 1994), accroissant leur probabilité d'extinction. Cependant, la vitesse de déclin de la diversité génétique des populations peut varier selon les traits d'histoire de vie et le régime de reproduction des individus. Kuo et Janzen (2004) se sont intéressés aux effets génétiques d'un goulot d'étranglement, persistant chez une petite population naturelle de la tortue boîte (*Terrapene ornata*) depuis un siècle du fait de la longévité de cette espèce. Bien que la signature d'un goulot d'étranglement récent soit détectable au sein de la population par des marqueurs microsatellites, son niveau de diversité génétique était peu affecté. La longévité de ces tortues diminuerait leur sensibilité à la dérive génétique ; mais selon des simulations, ce régime de reproduction ralentirait la vitesse de rétablissement de la population. Les auteurs suggèrent donc de mettre en place des mesures de conservation de cette population de tortues se reproduisant lentement, avant que son appauvrissement génétique soit trop avancé pour que la reproduction puisse contrebalancer la perte de diversité.

Parallèlement aux problématiques de conservation des espèces, les outils de génétique des populations ont été utilisés afin d'étudier plus particulièrement la biologie d'**espèces envahissantes**. L'objectif est de reconstituer historiquement la **dynamique** et le mode de

colonisation des populations d'espèces envahissantes, pour pouvoir proposer des stratégies de lutte adaptées à la structure génétique et aux facteurs favorisant la colonisation des espèces visées. De telles stratégies permettent de protéger les écosystèmes et leur espèces natives, parfois endémiques, d'une espèce introduite plus compétitive. Par exemple, *Spartina alterniflora* est une herbe envahissante : cette Poacée européenne colonise la zone intertidale de la Baie de Willapa (État de Washington) depuis un siècle. Stiller et Denton (1995) ont exploré la structure génétique de ses populations à l'aide de marqueurs RAPD, pour tenter de comprendre l'amélioration, depuis 15 ans, de l'efficacité d'établissement des graines. Cette étude a montré que la population de *S. alterniflora* de Willapa est majoritairement constituée de clones descendant d'un seul **géné**t (individu génétique), et les auteurs suggèrent d'exploiter ce résultat pour adapter les stratégies de lutte contre l'espèce envahissante en ciblant les individus actuels les plus prolifiques.

La caractérisation de la structure génétique d'une population envahissante est d'autant plus utile qu'il est très difficile de généraliser l'impact que peut avoir la variabilité génétique sur la capacité de l'espèce à coloniser de nouveaux habitats. Une faible diversité génétique est généralement considérée comme un facteur fragilisant une population. Mais elle peut aussi participer au succès d'une espèce envahissante, comme la fourmi argentine *Linepithema humile* : un goulot d'étranglement a réduit la diversité génétique de ses populations introduites en Californie. Cette perte de diversité réduirait l'agressivité intraspécifique entre des nids séparés et permettrait la formation de supercolonies de *L. humile*, dominant les colonies d'espèces de fourmis natives, plus agressives entre elles intraspécifiquement (Tsutsui *et al.* 2000).

Un cas particulier de l'étude de la structure des populations d'espèces envahissantes et des processus les modelant est l'**épidémiologie** d'agents pathogènes, touchant les activités et les productions, ou la santé humaine. En agronomie, la sélection produit des lignées variétales dont la résistance à l'infection est souvent modulée par des gènes majeurs induisant une résistance complète et des gènes 'mineurs' de résistance partielle à un agent pathogène. Cette stratégie de lutte, couplée ou parfois plus efficace que des traitements chimiques, présente cependant le désavantage d'être régulièrement contournée par les populations pathogènes,

dont les souches virulentes sont avantagées par la pression de sélection imposée par les cultivars résistants. Par exemple, la structure génétique des populations du complexe fongique *Leptosphaeria maculans* – *L. biglobosa*, responsable du chancre du collet de Brassicacées partout dans le monde, a fait l'objet de nombreux suivis agronomiques (*e.g.* West *et al.* 1999 ; Rouxel *et al.* 2003 ; Stachowiak *et al.* 2006 ; Dilmaghani *et al.* 2009). Ces études permettent de suivre la virulence des populations du pathogène. Associées aux connaissances des populations d'hôtes, elles permettent de comprendre les mécanismes de sélection naturelle (Pietravalle *et al.* 2006) et d'évolution moléculaire (des remaniements génomiques par exemple, Gout *et al.* 2007) associés aux phénomènes de **contournement de résistances** portées par les cultivars sélectionnés. Ainsi, la génétique des populations de micro-organismes phytopathogènes permet de comprendre leur évolution, et de construire des modèles épidémiologiques afin d'élaborer des stratégies de lutte variétale durables, adaptées à chaque pathosystème (population d'hôte – population d'agent pathogène).

En **médecine**, la génétique des populations a été appliquée à des approches épidémiologiques similaires, ainsi qu'à la compréhension de l'évolution des résistances. Par exemple, on observe depuis les années 1990 que la consommation de traitements antibiotiques exerce une forte pression de sélection sur les souches bactériennes infectieuses (Kunin 1993 ; Schwartz *et al.* 1997). Il existe en effet une corrélation positive entre le volume d'antibiotiques consommés par les populations humaines et la fréquence de la résistance dans les populations bactériennes visées (Austin *et al.* 1999), et Boni et Feldman (2005) ont démontré le maintien d'un polymorphisme élevé au sein des populations pathogènes quand la prise d'antibiotiques est peu fréquente. La compréhension de la dynamique des populations naturelles d'agents pathogènes dans le contexte de résistance aux antibiotiques reste cependant très incomplète, notamment à cause de l'hypervariabilité des conditions environnementales. Dans ce cas médical, l'approche empirique de génétique des populations *a posteriori* n'est pas la plus efficace pour maîtriser des populations envahissantes.

1.2.3. Structure génétique spatiale et approche biogéographique

Les premières études de génétique des populations furent majoritairement consacrées aux processus évolutifs au sein d'une population. Elles décrivent pour la plupart son régime de

reproduction en recherchant des excès d'homozygotes ou d'hétérozygotes par rapport à l'équilibre de Hardy-Weinberg, en caractérisant la diversité génétique de la population (F_{IS} ; Encadré 1), en testant l'occurrence de recombinaison (si elle existe, on n'observe pas ou peu de **déséquilibre de liaison** entre paires de loci). Certaines études sont consacrées plus précisément aux processus individuels, explorant la variabilité des taux de mutation dans une population, ou l'évolution du polymorphisme selon la neutralité des mutations (Sawyer et Hartl 1992 ; Pritchard 2001). D'autres travaux s'intéressent plus spécialement à l'importance de la sélection naturelle au sein d'une population (Kreitman et Akashi 1995), d'autres encore précisent le rôle de la dérive dans les populations (Gillespie 2000).

La plupart des travaux consacrés à l'étude fine des processus évolutifs individuels et intra-populationnels sont expérimentaux, menés sur des populations artificielles en laboratoire ou virtuelles, à des fins de modélisation ou de formulation théorique. Mais un autre aspect important de la génétique des populations est l'étude des interactions génétiques entre les populations. La comparaison des structures génétiques de plusieurs populations permet d'estimer leur différenciation génétique, et les flux de gènes entre elles.

Le premier estimateur de la différenciation génétique est le F_{ST} de Wright (1969, 1978 ; Encadré 1), qui permet d'estimer les **flux géniques** entre populations (il est proportionnel au nombre de migrants). Divers estimateurs de distance génétique entre populations ont été proposés depuis, comme le θ_{ST} (moins sensible au biais d'échantillonnage partiel des populations, Weir et Cockerham 1984), le G_{ST} (décrivant la distribution des variations uniquement au sein de l'échantillon de population, Nei 1977), ou le R_{ST} (analogue du F_{ST} prenant en compte les tailles d'allèles des microsatellites, Slatkin 1995). Ces estimateurs sont généralement adaptés à des populations ou des marqueurs moléculaires en particulier, et leur niveau d'information par rapport au F_{ST} de Wright est variable. Ils sont utilisés pour détecter des phénomènes d'**isolement par la distance** (Encadré 1 ; Wright 1943), en recherchant par des tests de Mantel une corrélation entre les distances génétique ($F_{ST}/(1-F_{ST})$, par exemple) et les distances géographiques entre populations (Rousset 1997), pour estimer le rôle de la distance géographique dans la différenciation des populations.

Cette approche d'isolement par la distance est également utilisée pour décrire la **structure génétique spatiale** locale des populations, par **autocorrélation spatiale** (Loiselle *et al.* 1995 ;

Smouse et Peakall 1999 ; Hardy et Vekemans 2002 ; Encadré 1). Elle apporte souvent des informations précises sur leur biologie, telles que l'étendue de leur **voisinage génétique** (le territoire sur lequel des individus adultes peuvent s'apparier ; Encadré 1), ou les capacités de migration et de **dispersion** de l'espèce. La description de la structure génétique peut également être temporelle. En effet, le caractère héréditaire de la plupart des marqueurs génétiques moléculaires permet, d'une génération à l'autre, l'**analyse de parenté** (Encadré 1) entre les individus. Cette **approche temporelle**, complémentaire d'une approche spatiale, améliore la connaissance du régime de reproduction d'une population. Peakall *et al.* (2003) ont par exemple étudié la structure génétique spatiale des populations du rat australien *Rattus fuscipes*, pour comprendre ses processus de dispersion associés à la fragmentation de son habitat. À l'aide de marqueurs microsatellites, les auteurs ont testé la corrélation entre la distance génétique des individus (piégés sur 8 placettes de 800 m chacune) et leur distance spatiale. Les analyses ont montré une autocorrélation spatiale positive jusqu'à 500 m, indiquant sur cette classe de distance que les rats échantillonnés à proximité les uns des autres sont plus proches génétiquement entre eux que des individus plus éloignés dans l'espace. Cette structure génétique spatiale à petite échelle refléterait, chez cette espèce, un flux de gènes par génération très restreint spatialement, malgré ses capacités de migration. Il semble alors intéressant de caractériser les capacités de dispersion d'organismes peu mobiles *a priori*, comme des plantes ou des champignons, pour étudier l'adaptation de leurs formes de dispersion en lien avec leur forme de vie « fixée ».

On assiste actuellement au développement de la **génétique du paysage** (Manel *et al.* 2003 ; Encadré 1), qui combine la génétique et l'écologie des populations liées à leur territoire, et prend en compte des facteurs d'isolement des populations autres que la distance géographique, tels que des barrières géographiques, la topographie du territoire, ou encore des couloirs naturels liés à la fragmentation des habitats. L'étude de la dispersion d'une génération à l'autre permet de suivre l'évolution de la structure des populations dans le temps. Mais l'histoire des populations, à plus long terme et à plus grande échelle, est accessible par l'étude de leur **biogéographie**. Cette approche s'intéresse à l'histoire de la distribution des espèces dans le temps et l'espace, et vise à révéler les influences des facteurs géographiques (**barrières géographiques**, dérive continentale), historiques (spéciation, extinction, changements globaux) ou environnementaux qui l'ont modelé. Les travaux précurseurs de la biogéographie

sont ceux de naturalistes qui ont cherché à expliquer la répartition des espèces qu'ils observaient, tels ceux de Wallace s'intéressant aux effets de barrières géographiques, comme la « ligne » virtuelle qui porte maintenant son nom, de part et d'autre de laquelle se répartissent les espèces malaisiennes (1869). La biogéographie actuelle inclut la **phylogéographie**, c'est-à-dire l'exploitation de ressources génétiques en plus des observations naturalistes pour reconstituer la biogéographie de complexes d'espèces. Les études de biogéographie reposent souvent sur des phylogénies, comme celle du champignon ectomycorhizien mortellement toxique *Amanita phalloides* aux États-Unis par Pringle *et al.* (2009). Cette espèce native d'Europe, selon les relevés mycologiques, aurait été introduite en Australie, Afrique du Sud, Amérique du Sud, et en Amérique du Nord (Pringle et Vellinga 2006). Elle a été relevée plusieurs fois aux États-Unis entre 1834 et 1910 aux États-Unis, mais beaucoup plus rarement par la suite. Actuellement, *A. phalloides* envahit toute de la côte Ouest du pays, et Pringle et ses collaborateurs ont décrit une partie de l'histoire de ses populations. Leur approche phylogéographique révèle des populations européennes plus abondantes et polymorphes, alors que les populations américaines auraient subi un goulot d'étranglement réduisant leur diversité. Les auteurs suggèrent, sur la base d'une phylogénie et d'observations mycologiques, qu'*A. phalloides* a été introduite en Californie vers 1938 ou 1945 par l'import d'essences forestières, et s'étend à présent du Sud au Nord de la côte par dispersion aérienne de spores de proche en proche, à une vitesse inférieure à 10 km par an.

Les outils de phylogénie sont les plus couramment utilisés actuellement en phylogéographie, mais concernent souvent un niveau supra-spécifique. Une approche de génétique des populations peut apporter des informations complémentaires sur l'histoire des populations d'une espèce. L'estimation des flux de gènes actuels ou passés entre les populations, la détection d'un **événement de fondation** par une perte de diversité génétique, ou encore l'apparition et/ou la fixation d'allèles privés permettent parfois de retrouver l'origine géographique d'une population, de caractériser la persistance d'échanges génétiques entre populations, ou au contraire d'estimer le temps de séparation entre les populations.

Mraz *et al.* (2007) se sont par exemple intéressés à l'histoire des populations de la plante *Hypochaeris uniflora*, des Alpes aux Carpathes, et ont comparé, sur la base de marqueurs AFLP, les diversités génétiques au sein de populations de ces deux massifs montagneux. Leurs analyses ont montré l'existence de deux groupes de populations disjointes, correspondant à

leur origine géographique, et d'une structure génétique spatiale entre les populations des Carpathes. Les auteurs expliquent cette structure géographique par la survie de *H. uniflora* dans trois refuges distincts (deux dans les Carpathes, un dans les Alpes) jusqu'à la fin de la dernière glaciation (environ 14000 ans) ; ils supposent une recolonisation des Alpes à partir d'un refuge à l'Est du massif, associée à des événements de fondation multiples, ce qui expliquerait la perte de variabilité génétique des populations alpines.

Malgré la disponibilité d'outils moléculaires et biostatistiques puissants, et la diversité des informations apportées par une approche de génétique des populations, les études de structure géographique spatiale des populations à très grande distance (continentale ou pluri-continentale) restent rares. Cette tendance pourrait être due à des difficultés techniques, ou des problèmes d'échantillonnage : il est difficile d'estimer la couverture d'échantillonnage nécessaire avant d'avoir analysé la structure des populations, et regrouper diverses populations demande des réseaux de collaboration efficaces (et altruistes). Ce manque d'études à très grande échelle pourrait éventuellement s'expliquer par la rareté des espèces présentant réellement une aire de répartition géographique cosmopolite, ou au moins pluri-continentale. Il s'agit souvent d'espèces végétales ou animales introduites par l'homme, domestiquées (plantes cultivées, élevage) ou commensales, colonisant de nouveaux milieux.

D'autres êtres vivants ont la capacité de se déplacer à très longue distance et de coloniser de nouveaux habitats : les micro-organismes peuvent se disperser de multiples façons et à très longue distance, soit par la migration de leurs vecteurs vivants, soit par leur transport abiotique (par exemple aquatique, Dolan 2005 ; mais surtout aérien, Rypien 2008, Prospero *et al.* 2005). Les bactéries et champignons ont été considérés dès le XIX^{ème} siècle comme des exemples d'espèces cosmopolites (« *everything is everywhere* », O'Maley 2007), et l'histoire de leurs populations dévoile d'intéressants modèles d'études de flux géniques à très longue distance –même si de nombreux exemples existent, dans lesquels des « espèces cosmopolites » microbiennes révèlent des phénomènes de spéciation cryptique d'un habitat à un autre (Taylor *et al.* 2006). Les populations de différents micro-organismes pathogènes ont été effectivement étudiées à une échelle globale, notamment dans un contexte d'épidémiologie humaine (par exemple *Mycobacterium tuberculosis*, Mazars *et al.* 2001), ou bien touchant les productions

agronomiques. Par exemple, Brown et Hovmøller (2002) proposent une revue des principales pandémies des cultures agricoles relayées par la dispersion à longue distance de spores de champignons phytopathogènes, telles que les rouilles de la canne à sucre et du café (*Puccinia melanocephala* et *Hemileia vastatrix*, d'Afrique de l'Ouest aux Caraïbes et à l'Amérique du Sud dans les années 1970), ou encore le mildiou de la pomme de terre (*Phytophthora infestans*, d'Amérique du Nord à l'Europe) dès 1845. Ces diverses études épidémiologiques sont de bons exemples de biogéographie globale, conjuguant des données d'observation avec des analyses génétiques pour retracer l'histoire des populations et de leur dispersion d'un continent à l'autre.

Ces applications de la génétique des populations microbiennes à une échelle globale ou pluri-continentale restent concentrées sur quelques espèces bien caractérisées et d'intérêt économique ou sanitaire majeur, malgré l'abondance en espèces et l'omniprésence de bactéries et champignons non pathogènes, d'écologies et d'habitats extrêmement variés. Un exemple d'écologie microbienne sous-représentée en génétique des populations est celle des champignons ectomycorhiziens, pourtant abondants et visibles à l'œil nu dans les forêts tempérées, et d'une importance écologique considérable pour ces écosystèmes. Leur caractère symbiotique obligatoire avec des plantes hôtes pourrait impliquer l'existence, au sein de ces populations, de processus évolutifs particuliers, différents des modèles de structure des populations fongiques pathogènes.

I.3. Génétique des populations de champignons ectomycorhiziens

I.3.1. Diversité biologique et fonctionnelle des champignons ectomycorhiziens

Une **mycorhize** (du grec *μύκης*, champignon ; et *ρίζα*, racine) est l'association, souvent mutualiste, du **mycélium** (Encadré 2) d'un champignon aux racines d'une plante. Cette **symbiose** est primordiale pour la nutrition de la plupart des végétaux actuels, et Smith et Read (2009) considèrent que « *les mycorhizes, et non les racines, sont les organes principaux d'assimilation de nutriments par les plantes terrestres* ». Cette association existerait depuis plus de 400 millions d'années (Redecker *et al.* 2000), et aurait rendu possible l'occupation des terres par les végétaux vasculaires : ils ne possédaient pas initialement de vraies racines, mais

auraient été colonisés par les hyphes de champignons y formant des vésicules et arbuscules (semblables aux mycorhizes arbusculaires modernes). Cette colonisation aurait rendu accessibles aux végétaux des nutriments du sol indisponibles aux individus non symbiotiques (Phipps et Taylor 1996 ; Selosse et Le Tacon 1998).

Les champignons mycorhiziens sont des membres spécialisés de la vaste communauté des microorganismes de la **rhizosphère** (la niche écologique formée par le sol au voisinage de la surface racinaire). Leur association à une plante est plus ou moins obligatoire, et la plupart des espèces mycorhiziennes sont totalement dépendantes de leur hôte pour leur nutrition carbonée. En revanche, ils sont capables de mobiliser dans le sol l'azote, le phosphate et d'autres nutriments, parfois à partir de réserves organiques, dont ils transmettent une partie aux racines de leur hôte (Smith et Read 2009). Les échanges nutritifs entre la plante et son partenaire fongique sont favorisés par la structure de la mycorhize, impliquant la pénétration des tissus racinaires par les hyphes fongiques, et la mise en place de structures de contact étroit entre le mycélium et la racine.

Il existe divers types d'associations mycorhiziennes, selon les caractéristiques anatomiques de la mycorhize (Figure 2) :

- (i) les endomycorhizes vésiculo-arbusculaires : des hyphes de Glomérormycètes forment des arbuscules ou des vésicules à l'intérieur des cellules racinaires d'Hépatiques, Ptéridophytes, Angiospermes ou Gymnospermes
- (ii) les endomycorhizes d'orchidées : des Basidiomycètes s'associent à des orchidées dès la germination des graines et colonisent l'intérieur des cellules racinaires par des structures en pelotons
- (iii) les mycorhizes éricoïdes : des Ascomycètes formant des pelotons dans les cellules racinaires d'Éricales ou d'Hépatiques
- (iv) les ectendomycorhizes et les mycorhizes arbutoïdes sont formées par des Asco- ou Basidiomycètes, respectivement avec des plantes Gymnospermes et Angiospermes ou des Éricales ; leur anatomie cumule des traits d'endomycorhizes (colonisation intracellulaire de la racine) et d'ectomycorhizes (présence d'un manteau et d'un réseau de Hartig plus ou moins développés)
- et enfin (v) les **ectomycorhizes**, qui associent des Basidiomycètes ou des Ascomycètes (rarement des Glomérormycètes) avec des plantes Gymnospermes ou des Angiospermes.

Les mycorhizes de type (iii) à (v), impliquant les mêmes espèces fongiques, sont de plus en plus souvent considérées comme des variantes d'un même type.

Une ectomycorhize est composée de quatre couches de cellules, qui créent une continuité entre la rhizosphère et l'intérieur de la racine de l'hôte (Figure 2) :

- un mycélium extra-racinaire, connectant le sol et les carpophores du champignon à la racine fine
- un **manteau** de tissus fongiques enveloppant la racine fine
- le **réseau de Hartig**, un réseau intra-racinaire d'hyphes mis en place entre les cellules épidermiques et corticales de la racine fine : c'est le lieu des échanges trophiques entre les partenaires
- le cortex central, purement racinaire.

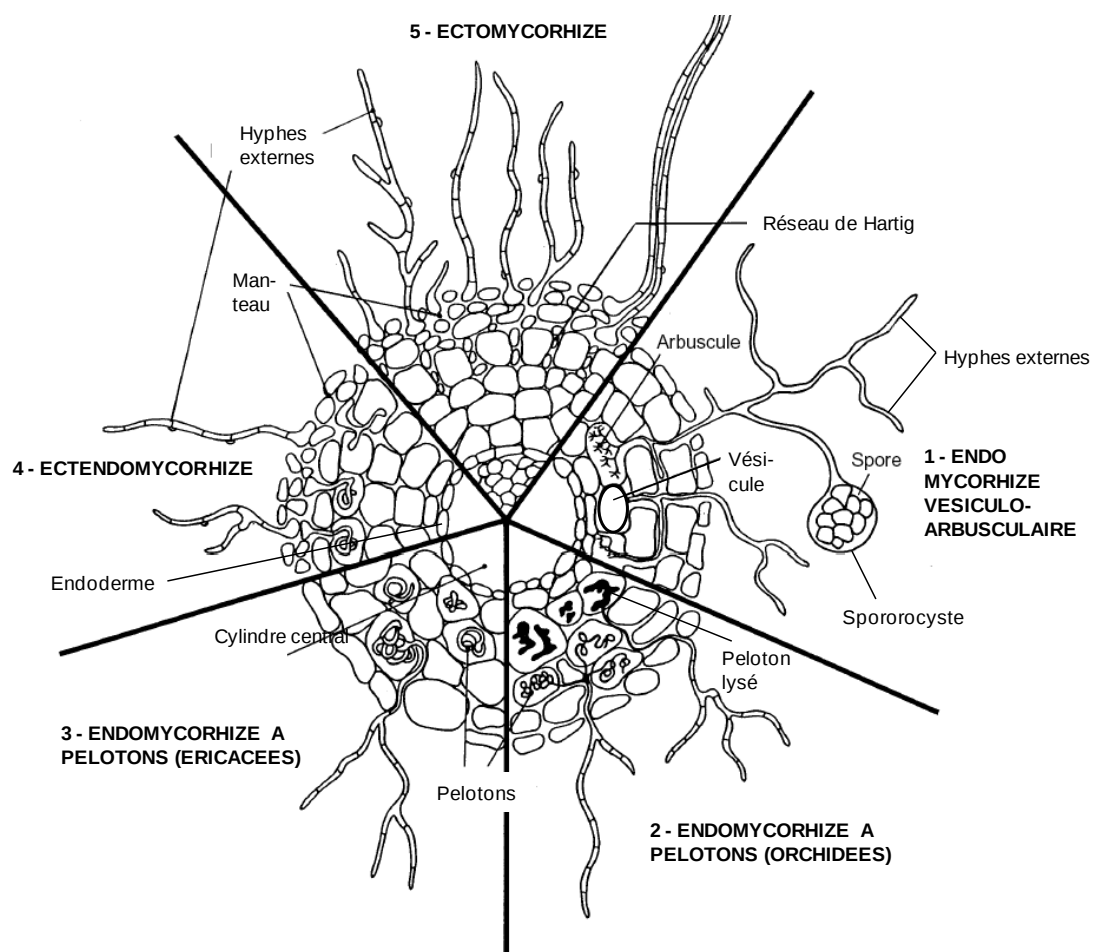


Figure 2 : Anatomie des différents types morphologiques de mycorhizes (Selosse et Le Tacon 1998)

Encadré 2 : Éléments de biologie et de génétique des champignons ectomycorhiziens

Caryogamie : fusion de deux noyaux présents dans une cellule suite à un événement de plasmogamie

Génet : individu génétique, comprenant l'ensemble de ses appareils végétatif et reproducteur ; chez un champignon, l'ensemble de son mycélium et de ses fructifications

IGS : *InterGenic Spacer*, portion d'ADN nucléaire contenant le gène codant l'unité 5S de l'ARNr (ARN ribosomal) chez la plupart des espèces fongiques ; variable aux niveaux intra- et inter-spécifiques, cette séquence contenant des motifs répétés en tandem a été utilisée comme marqueur moléculaire pour plusieurs études de génétique des populations fongiques

ITS : *Internal Transcribed Spacer*, portions d'ADN nucléaire situées entre les séquences des gènes codant les unités 18S, 5-8S et 25S de l'ARNr ; leur séquence est variable au niveau interspécifique et très conservée au niveau infraspécifique, c'est pourquoi l'ITS est utilisé comme « code-barres » d'identification moléculaire des espèces fongiques

Incompatibilité somatique (ou *incompatibilité végétative*) : système multigénique (le nombre de gènes impliqués varie selon l'espèce) d'incompatibilité des mycéliums végétatifs. Lorsque tout ou une partie des allèles sont différents pour deux mycéliums, l'incompatibilité bloque physiquement leur fusion. Si les mycéliums sont compatibles, ils fusionnent par plasmogamie et partagent leur ressources. Ce système autorise la fusion ou refusion fréquente des mycéliums de génets apparentés, ou totalement similaires selon l'espèce. Il a été couramment utilisé comme marqueur génétique pour étudier les populations de basidiomycètes avant le développement de marqueurs moléculaires plus puissants.

Incompatibilité sexuelle : système mono- (chez les Ascomycètes) ou pluri-génique (chez les Basidiomycètes) d'incompatibilité au moment de la caryogamie entre deux individus identiques génétiquement. Si les allèles de *type sexuel* (2 à plusieurs dizaines selon l'espèce) sont identiques pour les deux noyaux, la fusion n'a pas lieu ; sinon, les deux noyaux compatibles fusionnent, et le mycélium dicaryotique devient diploïde.

Mycélium : appareil de croissance végétative, constitué d'*hyphes*, filaments composés de plusieurs cellules entourées d'une paroi tubulaire chitineuse, et croissant indéfiniment par leur extrémité

Plasmogamie : fusion de mycélium entre deux cellules, impliquant l'échange cytoplasmique mais pas nucléaire

Ramet : groupe d'individus génétiques issus végétativement d'un même ancêtre ; chez les champignons, par fragmentation du mycélium d'un génet par exemple

Chez un champignon ectomycorhizien **Basidiomycète**, le cycle biologique est principalement diplophasique. Le mycélium monocaryotique germe à partir de **basidiospores** haploïdes (spores de reproduction sexuée), et fusionne par plasmogamie avec un autre mycélium compatible (Encadré 2), formant un **mycélium dicaryotique**. Ce mycélium dicaryotique souterrain forme l'**appareil végétatif** du champignon. Dans des conditions environnementales favorables, le mycélium dicaryotique génère des fructifications, ou carpophores, les **basidiocarpes**. Ces fructifications abritent les **basides** : des cellules où ont lieu la **caryogamie** de deux noyaux compatibles, et la production de basidiospores par méiose, qui seront dispersées à maturité du carpophore (Figure 3).

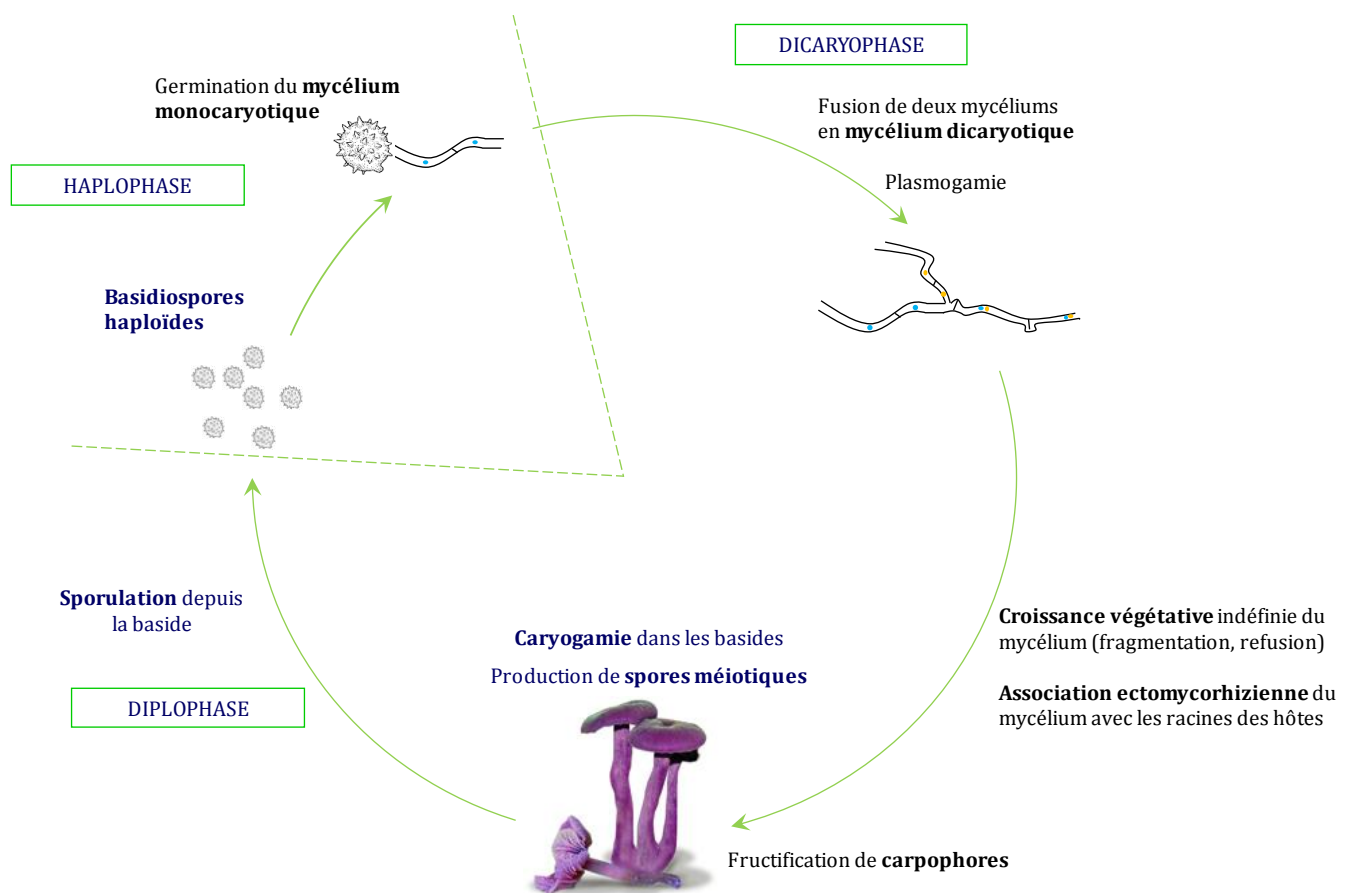


Figure 3 : Cycle biologique d'un champignon basidiomycète ectomycorhizien

Chez un champignon ectomycorhizien **Ascomycète**, le cycle de vie est principalement haplophasique. Le **mycélium haploïde** germe d'**ascospores** haploïdes (spores de reproduction sexuée), et forme l'**appareil végétatif** du champignon. Dans des conditions environnementales favorables, deux mycéliums haploïdes, s'ils sont compatibles sexuellement (Encadré 2), fusionnent pour former un mycélium secondaire dicaryotique. Les mycéliums primaires, haploïdes, forment la matrice du carpophore, l'**ascocarpe**. Cette fructification abrite les **asques** : dans ces cellules a lieu la caryogamie du mycélium diploïde, et la production par méiose des ascospores qui seront dispersées à maturité du carpophore.

Les cycles biologiques des champignons ectomycorhiziens ascomycètes et basidiomycètes diffèrent principalement par leur phase dominante, qui est celle du mycélium végétatif : la diplophase chez les Basidiomycète, l'haplophase chez les Ascomycètes. Mais pour les deux groupes, bien qu'il soit invisible car souterrain, le **mycélium végétatif** a la même importance. Il est **persistant** (potentiellement plusieurs années), et de **croissance indéterminée** dans le temps et l'espace. En se fragmentant et fusionnant par anastomose entre les hyphes (Reiner 1991) de nombreuses fois au cours de la vie du champignon, il forme un **réseau mycélien** où s'échangent des nutriments (Flicker 2007), qui participe à l'expansion et la dispersion clonale du champignon. D'autre part, le mycélium végétatif est à l'origine de la formation des ectomycorhizes avec les racines fines des hôtes (Smith et Read 2009). Basidiomycètes et Ascomycètes ectomycorhiziens se distinguent aussi par la morphologie de leurs **structures de reproduction sexuée** : les basidiospores sont principalement libérées en pluie directement sous le basidiocarpe, tandis que l'ascocarpe, ouvert vers le haut, favorise la dispersion des ascospores à plus longue distance par le vent ou leur éjection mécanique. Dans les deux groupes, les carpophores, bien que plus apparents que la structure végétative souterraine et persistante, ont une **durée de vie limitée** à quelques jours.

Les champignons ectomycorhiziens sont présents partout dans le monde, surtout dans les climats tempérés et boréaux. Ils représentent plus de 6000 espèces de Basidiomycètes et d'Ascomycètes (Brundrett 2002). Leur **rôle écologique** est primordial, et souvent sous-estimé : la majorité des arbres tempérés sont ectomycorhizés, et les essences à forte valeur ajoutée (principalement Pinacées, Fagacées, Diptérocarpacées) sont toutes associées à des

champignons ectomycorhiziens (Smith et Read 2009). Au-delà des nutriments et minéraux nécessaires à sa croissance, les champignons ectomycorhiziens apportent à l'arbre des protections contre les pathogènes racinaires et des stress environnementaux (stress hydrique, polluants ; Smith et Read 2009).

Par leur rôle nutritif envers leurs plantes hôtes, les champignons ectomycorhiziens jouent un rôle écologique important dans les **successions écologiques** : après des perturbations environnementales majeures (glaciation, activité volcanique), les sols sont très appauvris en nutriments et en inoculum fongique. Dans le cas de l'établissement d'une nouvelle succession primaire, les espèces mycorhiziennes de **stade précoce**, souvent généralistes et apportées par leurs spores, faciliteraient la recolonisation et l'établissement d'une nouvelle succession écologique dans le milieu, en apportant aux plantes pionnières les nutriments nécessaires à leur survie (Smith et Read 2009). La présence de partenaires fongiques ectomycorhiziens établis avec les plantes pionnières permet le recrutement de plantes de stades de succession suivants, tels *Betula ermanii* et *Larix kaempferi* qui s'établissent dans les zones colonisées auparavant par *Salix reinii* et ses partenaires fongiques sur les pentes du Mont Fuji (Nara et Hogetsu 2004). Des perturbations environnementales moins sévères (incendies, Bruns *et al.* 2002 ; Richard *et al.* 2009 ; coupes à blanc, Jones *et al.* 2003) peuvent affecter le milieu sans détruire totalement l'inoculum fongique du sol ; les espèces végétales de la succession secondaire profitent alors de cet inoculum qui facilite la mise en place de nouvelles interactions ectomycorhiziennes. Enfin, dans les stades avancés de succession, de nouvelles espèces de champignons ectomycorhiziens succèdent aux pionnières. Ces champignons de **stade tardif**, parfois plus spécialisés, persistent longtemps dans les forêts matures en y étendant leur mycélium, comme *Russula* spp. (Bergemann *et al.* 2006), *Suillus* spp. (Dahlberg et Stenlid 1990, 1994) ou *Xerocomus* spp. (Fiore-Donno et Martin 2001).

Les champignons mycorhiziens constituent ainsi un lien temporel entre les acteurs successifs de leur écosystème ; ils relient aussi leurs hôtes spatialement, formant entre eux des **réseaux mycorhiziens communs** (Simard et Durall 2004 ; Selosse *et al.* 2006 ; Figure 4). De nombreuses espèces ectomycorhiziennes présentent un large spectre d'hôtes, et d'espèces d'hôtes. Cette absence de spécificité à une plante hôte pourrait être un avantage pour l'arbre

comme pour le champignon : elle accroît la probabilité que les champignons et les racines de plantules trouvent chacun un partenaire approprié, et les associations pluri-partenaires de plantes et d'espèces ectomycorhiziennes, de physiologies variées, rendrait possible l'accès à un plus large éventail de nutriments pour chacun (Molina *et al.* 1992). Les interactions spécifiques entre une plante et son partenaire ectomycorhizien sont plus rares, mais le développement d'outils moléculaires révèle des tendances à la spécialisation chez certains champignons, parfois liée à l'existence d'espèces cryptiques, comme chez *Suillus* sp. et *Rhizopogon* sp. dont certaines espèces s'associent à un nombre restreint d'espèces de Pinacées (Bruns *et al.* 2002).

À travers les réseaux formés par le mycélium des champignons ectomycorhiziens ont parfois lieu des échanges nutritifs entre différentes espèces d'hôtes, dans des quantités et sur des surfaces encore peu étudiées (Simard et Durall 2004 ; Tedersoo *et al.* 2007 ; Selosse *et al.* 2006). Dans la plupart des cas de mycorhizes, la plante est autotrophe, et fournit du carbone au champignon. L'association est réellement mutualiste pour les différents partenaires fongiques ou végétaux, chacun en tirant un bénéfice nutritif. Mais il existe des cas où la plante n'est pas photosynthétique (Leake 2004) : les échanges nutritifs ne sont alors pas bidirectionnels et la plante se nourrit au détriment de son partenaire fongique. Entre le mutualisme réel et la « tricherie » des **plantes mycohétérotrophes** existent divers degrés de réciprocité, comme chez les plantes mixotrophes, autotrophes mais recevant des composés carbonés d'autres membres du réseau mycorhizien commun de leurs partenaires fongiques (Selosse et Roy 2009 ; Figure 4).

Toutefois, le rôle écologique des champignons ectomycorhiziens ne se limite pas à leur interaction avec leurs plantes hôtes : le mycélium de certaines espèces forme une interface importante de décomposition des matières organiques dans le sol (Read *et al.* 2004), rendant les nutriments produits accessibles à la faune et à la microflore de la rhizosphère et des sols forestiers en général (Figure 4).

Enfin, les champignons ectomycorhiziens peuvent avoir une **importance économique** non négligeable dans les écosystèmes forestiers. Certaines espèces ont été utilisées à des fins de mycorhization contrôlée, afin d'améliorer la survie et la croissance de plants repiqués de pépinières en forêt (Grove et Le Tacon 1993). Bien que la mise au point de l'inoculation relève

du défi technique et que sa répétabilité soit très variable pour certains champignons ectomycorhiziens, d'autres espèces ont effectivement été sélectionnées avec succès pour promouvoir la production forestière, comme *Laccaria bicolor* et *Hebeloma* sp. (Hung et Molina 1986) inoculés à des plants de *Pseudotsuga menziesii* ou *Pinus sylvestris*, ou encore *Pisolithus albus* inoculé à *Eucalyptus urophylla* (Dell et al. 2002).

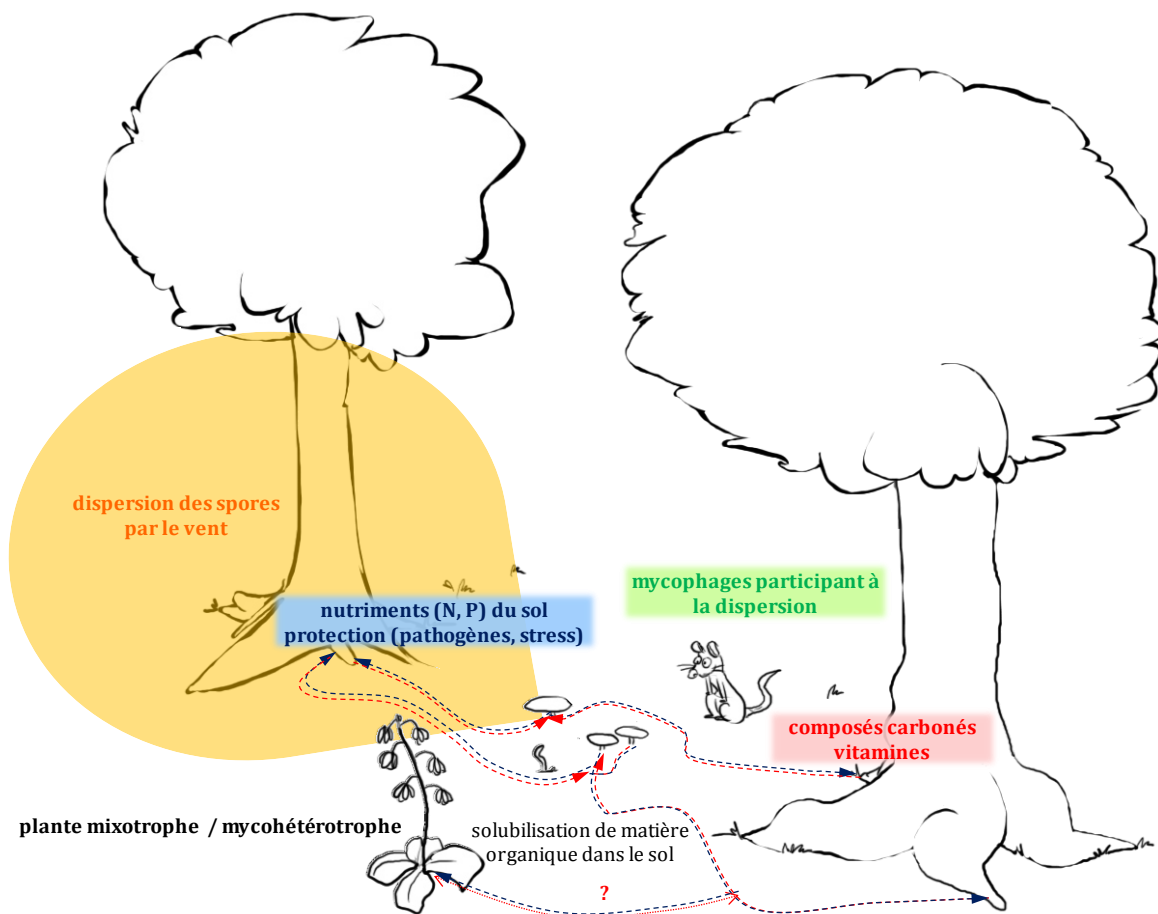


Figure 4 : Interactions des champignons ectomycorhiziens dans l'écosystème forestier. L'interaction entre les champignons et leurs plantes hôtes a lieu dans les mycorhizes (non représentées sur la figure). Les flèches en pointillés matérialisent des échanges nutritifs *via* le réseau mycélien (Dessin : Mélanie Laborde)

De manière plus apparente, certaines espèces comestibles très prisées génèrent des intérêts économiques majeurs, comme le matsutake (*Tricholoma matsutake*, jusqu'à 120€/kg en 2006) la truffe noire (*Tuber melanosporum*, jusqu'à 1300€/kg en 2006) ou blanche (*T. magnatum*), les cèpes (*Boletus edulis*), ou les shiitake (*Lentinula edodes*) par exemple (Smith et Read 2009). Yun et Hall (2004) estiment le volume du marché des truffes et du matsutake à plus de 1,4 M€ par an, et selon les statistiques de la *Food and Agriculture Organization* des Nations-Unies, plus de 3 millions de tonnes de « champignons et truffes » ont été récoltées en 2007. Cependant, à ces chiffres officiels s'ajoutent de très grandes quantités, difficilement estimables, de champignons comestibles. Elles sont récoltées sans être prises en compte, à des fins de consommation personnelle, mais aussi pour satisfaire à des demandes commerciales croissantes, comme les cèpes, girolles (*Cantharellus cibarius*), ou matsutake. À l'exception de quelques espèces comme les truffes (*Tuber* spp.) dès 1810 (Trappe 1977) ou les lactaires (*Lactarius deliciosus*, Guerin-Laguet et al. 2000 ; Parladé et al. 2004 ; Hortal et al. 2009), la production commerciale de fructifications de champignons ectomycorhiziens obtenues par inoculation n'existe pas. Les récoltes non comptabilisées, qui peuvent représenter un apport alimentaire ou financier important pour les récolteurs (Munyanziza et Ngaga 2006), peuvent aussi épuiser des ressources environnementales.

Une étude à long terme (30 ans) de l'impact de la récolte des champignons dans des forêts suisses de La Chanéaz (Egli et al. 2006) a montré qu'elle n'affectait pas le nombre d'espèces fructifiant, mais que le piétinement du sol forestier peut réduire le nombre de fructifications. Les auteurs supposent que le mycélium n'est pas endommagé et persiste dans le sol, mais fructifie moins souvent et moins abondamment. Cette décroissance de la fréquence de fructification liée au piétinement a été observée en particulier chez *Cantharellus lutescens* (Egli et Ayer 1997), et Egli et ses collaborateurs indiquent qu'il reste difficile d'estimer l'impact des pratiques de récolte (cueillette des carpophores limitant la dispersion des spores, piétinement) des champignons ectomycorhiziens sur leurs populations. Comme le soulignent McLain et al. (1998), des tentatives de mise en place de mesures de protection des champignons sauvages existent, proposant de réglementer leur récolte. Mais peu de mesures réelles de protection ou de conservation de champignons forestiers existent à présent. En Europe, 16 « listes rouges » nationales officielles et 11 non-officielles (dont la liste française), et diverses listes régionales,

constituées par des mycologues amateurs ou scientifiques, identifient les espèces fongiques vulnérables et/ou menacées de disparition. Dahlberg et Croneborg (2006) ont proposé d'inclure, dans les appendices de la Convention de Bern ou la Directive européenne de l'Environnement, une liste de 33 espèces fongiques menacées en Europe et qui devraient être soumises à des mesures de conservation.

1.3.2. Application de la génétique des populations aux espèces ectomycorhiziennes

L'impact de la récolte des champignons comestibles devrait être estimé précisément pour les différentes espèces ectomycorhiziennes d'intérêt afin de pouvoir proposer d'éventuelles mesures de **gestion des populations**. Des études de l'écologie et de la dynamique des populations concernées sont nécessaires pour évaluer leur statut et les pressions démographiques liées à la récolte, ou encore l'effet de l'introduction de plants inoculés. Ortega-Martinez et Martinez-Pena (2008) proposent d'estimer la production des espèces comestibles (*B. edulis* pour leur étude) à l'aide de transects relevant exhaustivement la production, et d'en évaluer les parts de production (i) récoltée, (ii) non récoltée, (iii) mangée par la faune sauvage, et (iv) endommagée. Winder et Keefer (2008) ont identifié les espèces végétales liées à la fructification de morilles (*Morchella* spp.) après des incendies de forêt en Colombie Britannique, et proposent de gérer la production de ces champignons en préservant leur habitat spécifique, par conservation des plantes associées et brûlis raisonnés.

Il est donc important d'étudier la structure génétique des populations à protéger, pour comprendre leur dynamique et adapter des mesures de conservation aux **ressources génétiques** disponibles. Cet effort de compréhension existe pour le matsutake : cette espèce a une forte valeur économique, mais n'est pas cultivée. Sa fructification naturelle dans les forêts japonaises décline fortement, vraisemblablement à cause de sa surexploitation et de la dégradation de son habitat (Yun et Hall 2004). Pour tenter de comprendre d'éventuelles bases ou conséquences génétiques de ce déclin, Lian *et al.* (2006) ont étudié la dynamique de 7 populations de *T. matsutake* du Nord-Est du Japon pendant 3 ans. Leur étude a montré une forte diversité intra-population, et l'importance de la reproduction sexuée, impliquée dans l'établissement de nouveaux génets (plusieurs fois par décennie) par dispersion de spores à longue distance (supérieure à 500 m dans ce cas), par le vent mais aussi par les mycophages

(animaux et récolteurs humains), suggérant le besoin de protéger une partie au moins des structures de reproduction sexuée. En déclin au Japon, la production de *T. matsutake* est actuellement essentiellement originaire du Sud-Ouest de la Chine, et Xu *et al.* (2008) ont analysé des populations de *T. matsutake* de 17 sites du Sichuan pour caractériser leur diversité génétique et proposer des mesures de gestion adaptées à ces populations. La diversité observée au sein des populations et la différenciation entre les populations, associée à un isolement par la distance sur 1000 km témoignent des ressources génétiques disponibles. Les auteurs soulignent l'importance des spores sexuées comme propagules pour la reproduction de l'espèce, et proposent d'imposer sur les sites de récolte qu'un certain nombre de carpophores arrivent à maturité pour sporuler sans être cueillis, afin d'entretenir la diversité génétique intra- et inter-populations.

Ces exemples appliqués au matsutake montrent les apports potentiels de la connaissance des populations d'un champignon ectomycorhizien menacé. Cette approche peut être utilisée chez d'autres ectomycorhiziens, à des fins de conservation ou d'amélioration de la production éventuellement, mais aussi parce que les connaissances de base sur la biologie et l'écologie de ces espèces sont encore limitées, malgré leur rôle dans les écosystèmes forestiers. Dès 1990, de nombreuses études ont porté sur la dynamique des populations d'espèces ectomycorhiziennes (Figure 5 ; Douhan *et al.* en préparation). Mais elles sont souvent restreintes dans le temps (la plupart des échantillonnages n'ont pu être réalisés que sur une année), et parfois réalisées avec des marqueurs génétiques peu puissants ou de caractère dominant, apportant peu de résolution quant à la structure des populations. Les premiers **génets** ont été différenciés par des tests d'**incompatibilité somatique** (Encadré 2) (Dahlberg et Stenlid, 1990, 1994 ; Baar *et al.* 1994), dont le pouvoir discriminant a rapidement été contesté (Jacobson *et al.* 1993). Le développement de marqueurs moléculaires plus puissants a permis l'étude plus précise de la structure génétique des populations locales, à travers la description des génets basée sur leurs fructification.

Ces études montrent des tailles moyennes d'individus très variables selon les espèces : inférieure à 1 m pour *Hebeloma cylindrosporum* (Gryta *et al.* 1997 ; Guidot *et al.* 2002) ou *Laccaria amethystina* (Gherbi *et al.* 1999 ; Fiore-Donno et Martin 2001), elle peut s'étendre

jusqu'à 30 m pour *Cortinarius rotundisporus* (Sawyer *et al.* 1999) ou *Suillus pungens* (Bonello *et al.* 1998). La variabilité des tailles des génets, supposées refléter leur âge – bien que les estimations d'âge soient basées sur des vitesses de croissance du mycélium *in vitro* – a permis à Dahlberg et Stenlid (1990) d'énoncer une hypothèse sur les **stratégies écologiques** des champignons ectomycorhiziens : les espèces pionnières (« *early-stage* ») présenteraient des génets petits et abondants, dans des forêts jeunes ; tandis que les espèces « *late-stage* » formeraient des génets larges et persistants, s'étendant végétativement dans des forêts matures. Cette hypothèse a été explorée, confirmée ou infirmée par les nombreuses études consacrées à la description des populations ectomycorhiziennes locales (Figure 5 ; Douhan *et al.* en préparation), presque toutes basées sur l'observation des carpophores, bien que quelques études portant sur la correspondance entre les diversités génétiques souterraine et épigée montrent de potentielles discordances entre ces deux images (Bruns et Gardes 1996 ; Douhan *et al.* en préparation ; Chapitre II). Les études portant sur la diversité entre populations d'une espèce ectomycorhizienne sont elles plutôt rares, dépassant rarement l'échelle de la centaine de kilomètres (Douhan *et al.* en préparation). L'étude des flux de gènes entre populations ectomycorhiziennes et de leur structure génétique spatiale peut pourtant révéler des modèles biologiques intéressants, et permettre de comprendre les facteurs affectant la structure de ces populations.

Quelques travaux ont par exemple révélé une structure génétique spatiale des populations de champignons ectomycorhiziens liée à leur mode de dispersion. Chez les espèces à fructification hypogée *Rhizopogon vinicolor* et *R. vesiculosus*, ou chez *Cenococcum geophilum* dont on ne connaît pas de structure de reproduction sexuée, une rapide différenciation des populations par la distance (5,5 km et 250 km respectivement) suggère la dispersion par des organismes mycophages (Kretzer *et al.* 2004 ; Jany *et al.* 2002). Tandis que les basidiospores de *T. matsutake* ou de *Russula brevipes* semblent pouvoir être dispersées à beaucoup plus longue distance (Xu *et al.* 2008 ; Bergemann et Miller 2002 ; Douhan *et al.* en préparation ; Chapitre III).

L'existence de diverses espèces cosmopolites de champignons ectomycorhiziens pose la question de la structure génétique de leurs populations à des échelles continentales ; en effet,

l'analyse de la différenciation des populations peut parfois révéler des espèces cryptiques, impossibles à distinguer par leur phénotype (morphologie macroscopique du carpophore, microscopique des spores et des basides par exemple), comme chez *Pisolithus* spp. (Hitchcock *et al.* 2003) ou *R. vinicolor* (Kretzer *et al.* 2003), mais disjointes génétiquement (Douhan *et al.* en préparation).

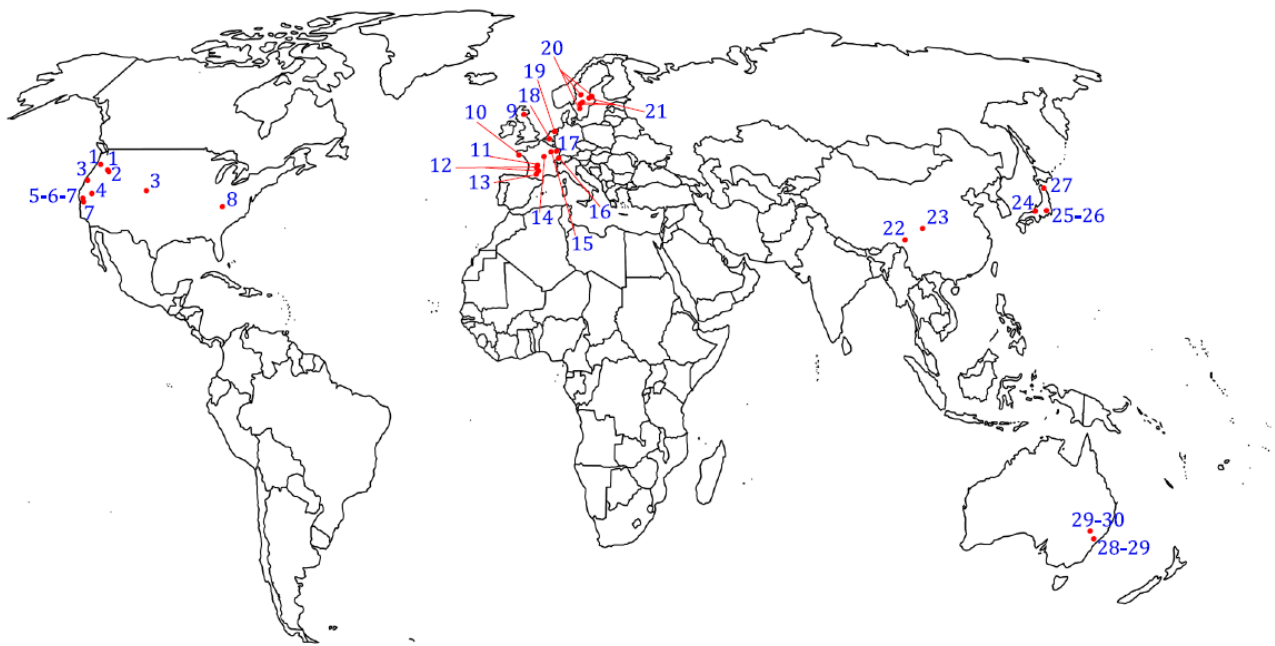


Figure 5 : Spatialisation des principales études de dynamique de populations locales d'espèces ectomycorhiziennes (citées par Douhan *et al.* en préparation). Cette figure ne reflète pas la réalité biologique des champignons ectomycorhiziens : bien que la plupart des études concernent des populations de l'Hémisphère Nord, la diversité des espèces ectomycorhiziennes ne se concentre pas dans ces zones géographiques, et les forêts tropicales, subtropicales et boréales en abritent également.

1 : *Rhizopogon vesiculosus*, *R. vinicolor* (Kretzer *et al.* 2004, 2005), **2** : *Cantharellus formosus* (Dunham *et al.* 2003, 2006), **3** : *Russula brevipes* (Bergemann *et al.* 2002), **4** : *R. brevipes* (Bergemann *et al.* 2006), **5** : *Suillus pungens* (Bonello *et al.* 1998), **6** : *S. pungens*, *Amanita franchetii* (Bruns *et al.* 2002), **7** : *A. franchetii* (Redecker *et al.* 2001), **8** : *Suillus granulatus* (Jacobson *et al.* 1993), **9** : *Hydnellum peckii*, *Phellodon tomentosus* (van der Linde *et al.* 2009), **10** : *Leccinum duriusculum* (Selosse 2003), **11** : *Hebeloma cylindrosporum* (Gryta *et al.* 1997, 2000 ; Guidot *et al.* 2002, 2003), **12** : *Tricholoma populinum*, *T. sculpturatum* (Gryta *et al.* 2006), **13** : *T. sculpturatum* (Carriconde *et al.* 2008), **14** : *Laccaria bicolor* (Selosse *et al.* 1998, 1999), **15** : *Cenococcum geophilum* (Jany *et al.* 2002), **16** : *Laccaria amethystina*, *Xerocomus chrysenteron*, *X. pruinus* (Fiore-Donno *et al.* 2001), **17** : *L. amethystina* (Gherbi *et al.* 1999), **18** : *Suillus luteus* (Muller *et al.* 2004, 2007), **19** : *L. bicolor* (Baar *et al.* 1994), **20** : *S. pungens* (Dahlberg *et al.* 1990), **21** : *S. granulatus* (Dahlberg *et al.* 1994), **22** : *Tricholoma matsutake* (Amend *et al.* 2009), **23** : *Russula vinosa* (Liang *et al.* 2005), **24** : *Suillus grevillei* (Zhou *et al.* 2000), **25** : *L. amethystina*, *L. laccata* (Wadud *et al.* 2006a, 2006b ; Wadud 2007), **26** : *C. geophilum* (Wu *et al.* 2005), **27** : *T. matsutake* (Lian *et al.* 2006), **28** : *Cortinarius rotundisporus* (Sawyer *et al.* 1999), **29** : *Pisolithus* sp. (Anderson *et al.* 2001), **30** : *Pisolithus tinctorius* (Anderson *et al.* 1998)

À travers l'article de revue '*New directions in population genetics of ectomycorrhizal fungi*', co-écrit par Greg Douhan, Lucie Vincenot (premiers auteurs associés), Dave Rizzo et Marc-André Selosse, nous avons voulu dresser un état des lieux en 2009 de la littérature scientifique portant sur la génétique des populations de champignons ectomycorhiziens.

De cette synthèse ressortent deux points principaux, qui ont été également les centres d'intérêt de mes travaux de thèse. Tout d'abord, pour étudier les populations des espèces fongiques ectomycorhiziennes, il est nécessaire de s'intéresser à leur biologie dans leur écosystème. Leur statut trophique, leur place (**stade**) dans la succession corrélée des hôtes et des symbiotes d'un écosystème forestier, leur stratégie de reproduction, sont des facteurs clés de la distribution spatio-temporelle –ou **dynamique des populations**. La nécessité de connaître les espèces mycorhiziennes et de décrire leur mode de vie s'exprime à travers l'abondance des études de populations locales, avant tout concentrées sur la taille des individus génétique (les **génets**), leur répartition, leur persistance, dans des écosystèmes précisément décrits. Ces études permettent de reconnaître chez les champignons ectomycorhiziens les stratégies écologiques R, C ou S d'abord énoncées chez les plantes (Grime 1977). Les travaux de Dahlberg et Stenlid (1990) sont considérés comme précurseurs, suggérant à partir du suivi de génotypes de *Suillus bovinus* que les vieilles forêts abritent de grands et vieux génets ectomycorhiziens, tandis que des milieux plus jeunes seraient colonisés par des espèces rudérales à génets nombreux et petits. Par la suite, la plupart des études consacrées à la dynamique spatio-temporelle de populations locales de champignons ectomycorhiziens (divers exemples sont donnés dans l'article de revue) se sont référées à cette assertion, la vérifiant ou la contredisant parfois.

Ensuite, il ressort de cette synthèse que peu d'études de génétique des populations d'espèces ectomycorhiziennes se sont étendues à de larges échelles, s'intéressant à la **structure génétique spatiale** de populations distantes de plusieurs centaines de kilomètres ou simplement dépassant l'échelle locale. Ce retard scientifique, pourrait s'expliquer par des problèmes de faisabilité (i) dus à la particularité de l'échantillonnage (carphores ne reflétant pas toujours la diversité génétique ; mycorhizes souvent contaminées par d'autres espèces ; temporalité de l'échantillonnage) et (ii) lors du développement de marqueurs moléculaires

pour les géotypages, face à des contraintes liées à la physiologie et à la biologie des champignons en général (difficultés de culture *in vitro*, structure génomique). Il pourrait également s'agir d'une certaine forme d'hésitation des scientifiques, liée au manque d'impact des travaux sur les espèces ectomycorhiziennes en général. Cependant, depuis quelques années les outils et les études de génétique des populations ectomycorhiziennes deviennent plus audacieuses, à des échelles variées, et dévoilent des modèles fongiques originaux, soulevant de nouvelles questions biologiques et soulignant la singularité de chaque espèce. Les approches biogéographiques se multiplient également, combinant parfois phylogénie et génétique des populations. Elles explorent l'histoire des ectomycorhizes et révèlent des patrons de spéciation insoupçonnés.

NEW DIRECTIONS IN POPULATION GENETICS OF ECTOMYCORRHIZAL FUNGI

G.W. Douhan¹, L. Vincenot², D.M. Rizzo¹, M. A. Selosse²

1: Department of Plant Pathology and Microbiology, University of California, Riverside, CA, USA.
92521

2: CEFÉ-CNRS, UMR 5175, Equipe Interactions Biotiques, 1919 Route de Mende, 34 293
Montpellier cedex 5, France

Keywords: Population genetics, ectomycorrhizae, fungi, molecular markers

Correspondence: Greg W. Douhan, email: gdouhan@ucr.edu, fax: 951-827-4132

Introduction

The mycorrhizal symbiosis between fungi and the roots of plants is a particularly important form of interaction which is present worldwide and is found in all temperate and tropical ecosystems. This association has existed for more than 200 billion years (Phipps & Taylor, 1996) and is thought to be the reason why vascular plants were able to colonize land. Most extant land plants are associated with mycorrhizal fungi which facilitate nutritive benefits (carbohydrates / nutrients and minerals) for both the plants and the fungi. Among these symbioses, ectomycorrhizae (EM) include at least 6000 species (Brundrett, 2002), involving Basidiomycete and Ascomycete fungi which are estimated to be associated with 95% of forest trees (Selosse & Le Tacon, 1998). EM fungi have a major ecological role, as they provide to the trees necessary nutrients and minerals, and also protections against root diseases and stresses (Smith & Read 2009); they are an important interface also for the delivery of carbon to forest soils, thus prolonging the nutrient cycle (Read *et al.*, 2004). EM associations are also considered for their economic importance and Yun & Hall (2004) estimated that c.a. 200 species of EM fungi are edible and many are economically profitable. For example, truffles in Europe and matsutake mushrooms in Asia are estimated to be worth over US\$ 2 billion/year (Yun & Hall, 2004). EM fungi have widely been recognized based on morphological characters, because most of them produce epigeous fruitbodies (*Laccaria*, *Russula*, *Pisolithus*, *Suillus*); but some are less visible, producing hypogeous ('truffle-like' fungi: *Tuber*, *Rhizopogon*) or resupinate (*Hydnellum*) or even no known fruitbodies (*Cenococcum geophilum*). These fruitbodies are the siege of the sexual reproduction of EM fungi, where the meiotic spores are produced, and are then dispersed from.

First attempts to understand diversity and ecology of communities of EM fungi did not focus on fruitbodies, but were based on the below-ground distribution of colonized mycorrhizal root tips characterized by gross morphology. However, the observed morphotypes often grouped into descriptive categories that often poorly correlated with described fungal species (e.g. Agerer, 1991-1995). Then, the utilization of molecular tools such as restriction fragment length polymorphisms (RFLP) and/or direct sequencing of rDNA from individual root tips (Gardes & Bruns, 1996; see Horton & Bruns, 2001) allowed the identification of species of EM fungi directly on host roots. Horton and Bruns (2001) reviewed the topic of EM community ecology and found three general observations: (i) there is generally a poor correspondence, in terms of species identity and richness, between fungi that produce the dominant above ground fruiting bodies and fungi that appear dominant on the roots (Gardes & Bruns, 1996; Peay *et al.*, 2007); (ii) underground EM communities

show unexpectedly high diversity and individual species are often patchy in their distribution (Richard *et al.*, 2004); and (iii) the same EM species can be shared by different hosts (Horton & Bruns, 1998; Horton *et al.*, 1999, Cullings *et al.*, 2000, Richard *et al.*, 2004).

An important next step in the ecological study of EM fungi was to apply the concepts and methodologies of population genetics to EM fungi. As defended by Egger (1995), the objective of the analysis of EM fungal populations is to characterize genetic diversity and the distribution of this diversity within a species, and to estimate the evolutionary forces acting on these populations. Early studies used somatic incompatibility (SI) growth reactions, which occur between genetically dissimilar individuals, on isolates from individual fruiting bodies to elucidate how EM populations were structured in natural ecosystems (Fries, 1987; Dahlberg & Stenlid, 1990). However, the step of isolation, required for SI tests, is difficult where numerous individual can be lost, or even unusable on EM fungal strains that cannot be cultivated *in vitro*. In addition, results from SI pairings can be ambiguous, even when a single isolate is paired with itself (Jacobson *et al.*, 1993). SI pairings only reveal differences between individuals at several loci involved in the reaction (Worrall, 1997) but not necessarily across the whole genome. Therefore, lack of SI between isolates taken from two different fruiting bodies does not necessarily mean that they are genetically identical (Jacobson *et al.*, 1993; Rizzo *et al.*, 1995; Rodrigues *et al.*, 1995). Therefore, commonly studied features like the genet size can be overestimated, or underestimated like the genetic diversity or the persistence of genets.

Molecular genotyping then provided better means to effectively delineate genets, and required less time. Molecular tools as RFLP, RAPD, microsatellites or SNPs are richer in alleles, repeatable, and can be chosen in non-selected loci. These techniques make it possible to genotype diverse types of samples such as epigeous or hypogeous fruitbodies and also mycorrhizal root tips to get a perspective on below ground genotypic composition (Kretzer *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Selosse *et al.*, 2002; Lian *et al.*, 2006), even when the species under study does not fruit (El Karkouri *et al.*, 2006). However, the majority of EM fungal population genetics studies to date have focused on determining the size of fungal individuals (i.e., genets) either based on SI or molecular approaches. These studies have generally been descriptive and used to indirectly make inferences concerning the reproductive biology and ecological strategies of EM fungi, e.g. colonization mainly by spores or mycelium (Gherbi *et al.*, 1999) founder effect (Selosse, 2003), phenotypic variability (Redecker *et al.*, 2001), growth rate (Gryta *et al.*, 2000), adaptation to the host (Gryta *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2008). But even if determining genet size has been an important first step in understanding fungal

EM population structure, this approach alone does not unravel all of the dynamics of EM populations.

Having a better knowledge of the population genetics of EM fungi can help us to understand the importance of evolutionary forces such as selection, migration, genetic drift, and recombination that likely shape fungal populations (Milgroom, 1996). Genotyping of fungal individuals using molecular markers makes it possible to test hypotheses about mating systems, population subdivision, gene flow, cryptic speciation or hybridization, and biogeography. This information can further be put into the context of physiological studies that aim to determine the function of the mycorrhizal symbiosis at scales ranging from individual host-fungal interactions to the community level across a particular landscape.

Although a number of reviews focused on various aspects of EM community ecology (Dahlberg, 2001; Horton & Bruns, 2001; Taylor, 2002), no review has specifically been devoted to EM population genetics. Even if still scarce, in term of frequency compared to other organisms, these studies are getting more numerous and the acceleration of publications of population genetics devoted to EM fungi is currently visible. A review of the literature reveals two common themes, since most studies (i) either place an emphasis on the size of genets or genotypes to make inferences on reproductive biology and fungal ecology, or (ii) widen the approach to biogeography and a more global view of the populations. We aimed to show the promising expansion of these fields, that when applied at different levels, can reveal many knowledge on the biology and ecology of EM fungi.

EM Ecology and Population Biology

Ecological strategies in EM fungi

The first text book devoted to fungal ecology, *The Fungal Community*, by Wicklow & Carroll, was not published until 1981 (Frankland, 1998). Then, it is not surprising that the discipline of plant ecology has influenced the study of fungal ecology. For example, the term ‘genet’ originated in the plant ecology literature (Harper, 1977) to represent individuals originating from a mating event (= a zygote) and has been used most often in the EM literature to differentiate between genetically distinct individuals and to make inferences on reproductive biology.

In the case of EM fungi, in accordance with Dahlberg & Stenlid's (1990) study and Deacon & Fleming's (1992) assumptions, species with numerous small genets are considered to reproduce primarily from sexual spores (i.e., basidiospores, ascospores) and establish new individuals each year (*Laccaria amethystina*, Gherbi *et al.*, 1999; *Hebeloma cylindrosporum*, Guidot *et al.*, 2003; *Cantharellus formosus*, Dunham *et al.*, 2003; *Tricholoma matsutake*, Lian *et al.*, 2006; *Tricholoma scalpturatum*, Carriconde *et al.*, 2008). In contrast, species with a few large genets across a landscape are considered to have limited reproduction by spores and reach their large sizes primarily through somatic growth of a perennial mycelium, sometimes followed over several years (*Laccaria* sp., Selosse *et al.*, 1998; *Suillus pungens*, Bonello *et al.*, 1998; *Cortinarius rotundisporus*, Sawyer *et al.*, 1999; *Xerocomus chrysenteron*, Fiore-Donno & Martin, 2001). However, as it will be addressed below, these hypotheses have largely not been tested using genetic analyses, and some examples now reveal contradiction with this paradigm.

Mycologists have also adopted the concepts of strategy theory from plant ecology in an attempt to classify fungi into functional types based on ecophysiology and reproductive biology (Pugh, 1980; Cooke & Rayner, 1984). Within the framework of strategy theory, a continuum of individual strategies based on two main types of natural selection has been described (Harper & Ogden, 1970; Gadgil & Solbrig, 1972). The first type, r-selected, have a short life expectancy and commit most of their resources to reproduction. The second type, K-selected, have a long life expectancy and devote only a small portion of resources to reproduction at one time or only reproduce at the end of their life span. This r-K model was further expanded to describe overlapping domains within three primary strategies R, C and S (Grime, 1977): (i) organisms with combative or competitive strategy (C) maximize the ability to exploit resources and exclude competitors under low stress and low disturbance conditions; (ii) ruderal strategy (R) organisms have a short life span with high reproductive potential and are highly successful in nutrient-rich but disturbed sites where they arrive first; (iii) stress-tolerant strategy organisms (S strategy) have adapted to live under continuous environmental stress. These primary strategies can overlap in secondary strategies (C-R, C-S, C-S-R) combining features of each type.

Strategies theory has been applied to EM fungi in the framework of host population establishment and ageing. They have been described as “early stage” or “late stage” species, roughly corresponding to the r and K-selected types, respectively (Deacon & Fleming, 1992; Kreizer & Arnolds, 1994), as well as “multi-stage” species (Danielson, 1991) based on reproductive and ecological features of the

species. Early stage EM fungi (as *L. bicolor*, de la Bastide *et al.*, 1994; *Pisolithus tinctorius*, Anderson *et al.*, 1998; *Suillus luteus*, Muller *et al.*, 2004) are believed to be pioneer colonists that primarily sexually reproduce and are associated with disturbed habitats. Late stage species (*Cortinarius rotundisporus*, Sawyer *et al.*, 1999; *Russula brevipes*, Bergemann & Miller, 2002; *Tricholoma matsutake*, Amend *et al.*, 2009) are thought to primarily reproduce by mycelial expansion (*i.e.* vegetative growth) and occupy habitats that are at climax. Multi-stage species (*Suillus brevipes*, Visser, 1995; *Leccinum scabrum*, Kranabetter, 1999) exhibit intermediate characteristics, and many early-stage species may survive in older stands (Visser, 1995). These concepts have been widely used in the EM population genetics literature to describe and explain the importance of sexual reproduction (considered as an attribute of early stage species) versus mycelial expansion (considered typical of late stage species), based on the size and distribution of individual genets in a given ecosystem.

As a good example highlighting how population genetic data can be used to understand ecological features of EM fungi, Gardes & Bruns (1996) were able to demonstrate for the first time conclusively that species with the most frequent above ground fruiting bodies were not necessarily the most common species found on the root tips in a *Pinus muricata* forest using ITS-RFLP. *Suillus pungens* was the most frequent fruiter within their research plot, but accounted for less than 3% of the ectomycorrhizal root tips. They proposed two hypotheses to explain these results; (i) *S. pungens* invests fewer resources into vegetative growth and persistence within this community compared to other species, and (ii) *S. pungens* has more access to carbon or more efficiently transfers carbon compared to other dominant species, possibly from a mixture of biotrophic or saprotrophic abilities. However, Gardes and Bruns also noted that the discrepancy between the above and below-ground community could have also been due to sampling bias because hypogeous and cryptic resupinates, such as *Thelephora* spp. and *Tomentella* spp., may have not been detected. In a follow up study, Bonello *et al.* (1998) suggested that under the first hypothesis proposed by Gardes & Bruns (1996), *S. pungens* would behave as an R strategist and reproduce primarily by basidiospores resulting in a genetic structure where numerous small genets would occupy a given site. Under the second hypothesis, *S. pungens* would behave more as a C or S strategist and would produce large and persistent genets with a competitive advantage due to larger carbon acquisition. To test these hypotheses, Bonello *et al.* (1998) characterized the genet size of *S. pungens* using RAPD markers. They revealed that a single genet covered an area of at least 300 m², suggesting that vegetative reproduction was important in this species, but also found genets consisting of individual

basidiocarps. The genetic structure was consistent with random mating, suggesting that *S. pungens* predominantly outcrosses when sexually reproducing and concluded that *S. pungens* has an intermediate strategy combining R, C, & S characteristics. This was further supported by a latter study by Bruns *et al.* (2002) on *S. pungens* sporocarps: at the location of the large clonal genet found by Bonello *et al.* (1998), after a devastating fire, they found small numerous genets dispersed around their plot.

Deacon and Fleming (1992) stated that ‘the early stage-late stage distinction is unlikely to be absolute; it may serve only to identify the ends of a spectrum of behavior, which is also influenced by other factors.’ As these authors speculated, results from studies on the population structure of EM fungi, as discussed below, have not necessarily followed this general concept and puts into question the validity of using such terms to describe ecological attributes of EM fungi. However, we will briefly review these concepts with respect to genet size and the apparent ‘early’ stage and ‘late’ stage designation given within the literature.

EM Genet size

Two common concepts based on early studies (Dahlberg & Stenlid, 1990, 1994) of EM population genetics were: (i) species with few large genets were thought to reproduce by mycelial expansion and were often considered late stage species whereas species with numerous small genets were thought to reproduce from basidiospores and were considered early stage fungi and; (ii) forests which are old and stable host EM species with few large genets (late stage species) whereas disturbed ecosystems host EM species which establish by means of sexually derived spores, producing numerous small genets (early stage species).

Dahlberg & Stenlid (1990) suggested that old forests mainly consist of large and old genets that apparently do not intermingle within the substrate based on the genet sizes of *Suillus bovinus* and to a lesser extent *S. variegatus* (Dahlberg & Stenlid, 1994). For example, the maximum genet size of *Suillus bovinus* in Scots pine forests in Sweden that were 15-20 years old compared to 70 to 160 years old were 1.7 to 5.3 m and 6.8 to 16.8 m, respectively. The authors suggested that after a disturbance, new genets would establish from basidiospore inoculum and that over time, many would die or be out competed with only a few genets remaining to spread by mycelium over a large area. This is consistent with the findings of Bruns *et al.* (2002) for *S. pungens* in a bishop pine forest in

California as stated above from their pre and post fire study of genet size. Sawyer *et al.* (1999) also agreed with the statement from Dahlberg and Stenlid (1990, 1994) by the study of a local population of *Cortinarius rotundisporus* in a native Australian sclerophyll forest. As expected, this late-stage species showed few and large genets (up to 30 m), likely resulting from pluriannual mycelial expansion. In a similar way, Fiore-Donno & Martin (2001) identified in a 140 years old forest very extended genets of *Xerocomus* spp. and they hypothesized that one large genet of *X. chrysenteron* may have established during the same time that its host *Picea abies*.

Although both concepts have held true in some respects, additional studies over the past several years have found that these concepts are not absolute. *Hebeloma cylindrosporum* is a good example where both non-persistent small genotypes have been observed, consistent with sexual reproduction and early stage fungi, and where larger persistent genotypes have also been observed, consistent with vegetative spread and late stage fungi (Gryta *et al.*, 1997, 2000; Guidot *et al.*, 2002). Gryta *et al.* (1997) found that in two out of three sites where basidiocarps were sampled and genotyped, no genet exceeded 500 cm² and that there was a complete turnover of genotypes observed each year for three consecutive years of sampling. In contrast, one collecting site contained larger genets that were persistent over the three years of sampling. As further confirmed by Guidot *et al.* (2002), these contrasting life strategies correlated with environmental conditions of the research plots and factors of competition with other EM fungi. The high turnover of genotypes was observed in an established, often anthropically disturbed forest, where EM symbioses are regularly eliminated, offering niches to be colonized by new genets of *H. cylindrosporum*. For example, persistent genotypes were found associated with pines established on dunes with deep root systems and EM communities facilitating the persistence of the genets of *H. cylindrosporum*. Other cases of EM strategies affected by environmental factors have been described, such as *Suillus grevillei*: Zhou *et al.* (2000) studied its populations in two *Larix kaempferi* stands and found that the genet average sizes were very different according to the site (0.7 m vs. 2.3 m), and non concordant to the age of the stand; the authors suggested that these patterns may be explained by environmental conditions, such as the level of animal and anthropic disturbance of the sites. Gryta *et al.* (2006) showed that the strategies of *Tricholoma populinum* and *T. scalpturatum* would directly be linked to the host population, *T. populinum* being specially associated to *Populus nigra* while *T. scalpturatum* is more generalist.

Several studies have contradicted the notion that mature forests host primarily late stage species with large genets (Gherbi *et al.*, 1999; Fiore-Donno & Martin, 2001; Redecker *et al.*, 2001). In a mature

and closed canopy 150-year-old beech forest, Gherbi *et al.* (1999) found up to 134 genets per 100 m² of the early stage species *L. amethystina*. The majority of basidiocarps were represented by a single fruiting body and the largest genet only covered 1 m². Similar results were also found in an independent study in an undisturbed mixed (conifer and deciduous trees) forest stand in the Swiss La Chaneaz reserve for *L. amethystina* (Fiore-Donno & Martin, 2001). Redecker *et al.* (2001) found that the genet sizes of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita franchetii*, all considered to be late stage species, were relatively small (1.1 m² to 9.3 m²) and concluded that establishment by sexually derived basidiospores was dominant in these species within their research plots. Bergemann & Miller (2003) found that most genets of *Russula brevipes* associated with lodgepole pine (100 years old) and Sitka spruce (40-60 years old) were less than 3 m in diameter, but did find basidiocarps up to 18 m apart that were in the same genet and identified one genet that persisted over an 11-year sampling period. In 40 to 80 years old mixed forests, Kretzer *et al.* (2004) considered *Russula vesiculosus* to be a pioneer species because they found unexpectedly large genets that were 13.5 m wide. And recently, Amend *et al.* (2009) suggested that the genetic structure of populations of *Tricholoma matsutake* could be correlated to the age of the forest. Contrary to what could be expected, large genets of *T. matsutake* were found in young 50 years old forests due to founder effects whereas the diversity of the genets increased in older forests.

Size may not always correlate with age; while large genets necessitate some time to reach their size, the smallest ones may be old, non- or slow-growing individuals. In a comparative study of *Leccinum duriusculum* populations between stands of varying ages, fruitbodies of the largest genet in a 4-5 years old population were 10.4 m away, while under >70-year-old stands most distal fruiting bodies of the same genet were <6.5 m apart (Selosse, 2003). A similar trend was reported from *Suillus grevillei* populations under 35-year-old and >85-year-old *Larix kaempferi*, with larger genets occurring in the former case (Zhou *et al.*, 2000). Such discrepancies can be explained by different disturbances such as animals that contribute to mycelial dispersal (Zhou *et al.*, 2000) or by intraspecific competition (Selosse, 2003). Under the later explanation, lower competition in newly established stands due to low genet number allow faster size increase, whereas higher competition in old stands limit size increase. An often overlooked feature of EM fungi (as compared to saprotrophic or necrotrophic fungi) is the fact that they do not exhaust their substrate and can survive without growth from one year to another. In addition, EM growth rates can reach a meter per year (Selosse, 2003), possibly due to mycelial dispersion by various vectors, and are probably not the limiting factor for genet size. Thus, size may be more related to population dynamics than to reproductive

strategy – as we will see below, population genetic analyses allow for a more direct assessment of the later feature.

A last good example to summarize the contradictions between a theoretical, idealistic notion of biological strategies well-reflected by the genet size and correlated to the age of the forest would be species in the genus *Laccaria*. *Laccaria amethystina*, *L. laccata*, and *L. bicolor* are considered as early stage fungi where sexual reproduction and establishment via basidiospores on a yearly basis is thought to be important (Gherbi *et al.*, 1999; Fiore-Donno and Martin, 2001; Wadud *et al.*, 2007). However, some genets of *L. bicolor* and *L. laccata* have been shown to persist over a sampling period of 2 to 3 years (de La Bastide *et al.*, 1994; Selosse *et al.*, 2001; Wadud *et al.*, 2007) and up to decades for artificially inoculated strains (Selosse *et al.*, 1997, 1999), and genets of *L. bicolor* could extend to 12.5 m (Baar *et al.*, 1994). *L. amethystina* indeed shows small genets, <1.20m (Fiore-Donno & Martin, 2001; Wadud *et al.*, 2006). Fiore-Donno and Martin (2001) concluded to an annual renewal of the genets of *L. amethystina*, but in other studies several genets were sampled two to three years apart (Gherbi *et al.*, 1999; Wadud *et al.*, 2007; Vincenot, personal observation), on three different sites with contrasted environmental conditions. The amount of persistent genets varied, from small fraction of the identified genotypes (8/388 from Gherbi *et al.*, 1999) to 40% for Wadud *et al.* (2007).

It is not surprising that overall generalities on EM ecology, regarding the population genetic structures of EM species based on genet sizes and more-or-less corresponding strategical stages, are difficult to make given the diversity of fungi able to form EM associations (Hibbett *et al.*, 2000). Studies built on inferences on genet size do not allow us to resolve all the lacks we still have in understanding the basic EM ecology. But the above-mentioned transposability of concepts from plant ecology e.g. to EM fungi is promising of also transposable tools, for a better comprehension of their dynamics and strategies.

EM Population Genetics

Much insight has been gained with respect to genet size and distribution of various EM species in recent years due to the application of molecular techniques. However, many studies have only used

molecular methods as diagnostic tools and thus under-utilized the potential information provided by such techniques. In the second half of this review, we discuss the importance of basidiomycete biology to understand the particularities of the application of population genetics to EM fungi and its challenges.

The importance of EM population genetics

Little is known about the population biology of most mycorrhizal species, which is intrinsically tied to how forest ecosystems function and evolve. Moreover, we still do not understand many of the fundamental life history processes that shape EM populations such as the part of mating versus vegetative growth, or the importance of inbreeding and its effects on the population structure at local to global scales. The study of EM population genetics can provide insights regarding these questions. It can also allow to widen the scope of the studies, by characterizing gene flow between populations at different scales, differentiation between populations putatively reflecting environmental variations or barriers, isolation by distance... Population genetics analysis can also be a powerful tool to detect cryptic speciation, which may be frequent in EM fungi, and eventually cryptic sexuality.

Plant pathogenic fungi have received a considerable amount of attention in the study of population structure (Douhan *et al.*, 2001, 2002; McDonald *et al.*, 2003; Dilmaghani *et al.*, 2009). The reason for this is because of the economic impact of plant diseases and that information regarding the population biology can be used to make decisions on fungicide usage or the deployment of resistance genes (MacDonald *et al.*, 2003; Milgroom & Peever, 2003; Gout *et al.*, 2007). We argue that knowledge of population structure of EM fungi can not only help us to better understand the biology, ecology, and evolution of these ecologically important fungi, but can be used to help guide forest management and conservation practices for economically important EM species (improvement of host growth, fruiting body production in terms of yield but also of conservation of the productive strains). Having a better biological understanding of EM fungi is especially important given the ever-increasing pressures exerted on forest ecosystems due to human activities which can lead to the loss of local host tree diversity, habitat loss and fragmentation, nitrogen deposition, erosion, soil compaction, and other problematic ecological consequences.

Basidiomycete reproductive biology

A basic understanding of sexual and somatic compatibility systems is necessary to adequately understand population biology of EM fungi since these phenomenon regulates how genes are distributed, moved, and shared among individuals and populations. Assessment of fungal populations through use of molecular methods must ultimately be put into context with actual mating events and interactions among hyphae in the soil and host substrates. In the Hymenomycetes (where most ectomycorrhizal fungi are classified), mating systems have been most thoroughly studied in the genera *Schizophyllum* and *Coprinus* (Brown & Casselton, 2001). More research, however, is needed to elucidate the genetics behind mating in other species that do not always follow the same mating and nuclear migration patterns as these model systems.

Mating systems regulate sexuality. The standard hymenomycetous life cycle begins with the fusion of two short-lived homokaryotic hyphae to form a long lived dikaryon. In Hymenomycetes, production of fruiting bodies that bear the meiotic spores is usually spatially and temporally separated from mating events. Mating systems may be unifactorial or bifactorial with multiple alleles at each locus in the population (Brown & Casselton, 2001). For a compatible mating reaction to take place, the interacting hyphae must harbor different alleles at the mating factor loci. Somatic incompatibility (SI) systems operate in the recognition of non-self genes and regulate the interactions between hyphae of different fungal individuals during vegetative life. In the Hymenomycetes, SI is mostly observed in interactions between dikaryotic secondary mycelia. SI interactions may contribute to prevent intraspecific parasitism by restricting fusion to kin, and the spread of viruses. Mating in EM fungi is also controlled by complex autoincompatibility systems. They promote outbreeding, but do not prevent inbreeding since meiotic sister spores carrying compatible alleles can mate. There are many potential variants on this theme, including fruiting of homokaryons (Labarère & Noël, 1992) and the production of dikaryotic spores (Bonello *et al.*, 1998). Ecologically, these interactions are critical because they take part in the shaping of spatial relationships among individuals of the same fungal species, allowing competition or cooperation to take place. However, there are exceptions to this pattern. For example, not all hymenomycetes are dikaryons; many species have multiple nuclei within each cell (heterokaryotic hyphae, e.g., *Rhizoctonia* spp., *Phellinus* spp.). *Armillaria* species have a diploid mycelium and the mycelial thallus of *Heterobasidion annosum* is a mixture of homokaryotic and heterokaryotic hyphae.). What effects these varying nuclear conditions can have on shaping EM populations is not known and further highlights our lack of general

understanding this field. Moreover, theoretical tools to describe population genetic structure are based on diploid animal models so that many of the assumptions based on life history are violated with respect to fungi which highlights the need for more appropriate theoretical model to be developed for fungi and other microbes that differ in so many respects to general animals.

The challenge of EM population biology

Understanding population genetics of EM fungi has lagged far behind that of fungal pathogens and saprotrophs. This is most likely due to the fact that EM fungi pose some difficult challenges to researchers because most cannot be grown in culture under laboratory conditions, unlike many fungal pathogens and saprotrophs. The ability to artificially reproduce the life cycle under laboratory conditions has also not been worked out for most EM species that can be cultured *in vitro* but still require hosts tree to fruit. This makes it difficult to understand the genetic bases of phenotypes or molecular markers, which is important in the interpretation of genetic data.

The most common, because easiest and less-damaging for ecosystem way to study populations of EM fungi is then to collect fruitbodies on characterized study sites. An ideal way of sampling populations would be to directly collect mycelium or mycorrhizal structures. Even if few studies are based on sampling of mycelium or sclerote, (LoBuglio & Taylor (2002) on *Cenococcum*, Wadud (2007) on *Laccaria* sp.; Amend *et al.* (2009) on *shiros* of *T. matsutake*) or qPCR with species-specific primers directly applied to soil to characterize extraradical mycelium (Guidot *et al.* (2003) on *H. cylindrosporum*; Van der Linde *et al.* (2009) on *Hydnellum peckii* and *Phellodon tomentosus*), this is still difficult to directly sample below ground populations. Effectively, many EM fungi do not form hyphal cords or rhizomorphs that can be sampled from the soil, and the morphology of the mycorrhizae on the hosts are often not known, or not characteristic enough, making it difficult to identify species at the below ground level to conduct a population genetic study. Moreover, sampling mycelia or mycorrhizae is in any way disruptive for the study site. Then, many studies still rely on fruitbodies sampling schemes even if the authors are aware that many EM species fruit erratically and that all the genetic diversity of a sampling site may not be represented.

A primary aspect to population genetics is to examine genetic variability within and among populations of organisms. These data can be used to understand how populations of individuals are related to each other at various spatial scales and how reproductive biology, gene flow and

movement of individuals effect the spatial structuring of populations. Questions regarding intra-population structuration: relative importances of sexual and vegetative reproductions, inbreeding and recombination amounts, level of local genetic diversity can be solved by basic statistics e.g. tests for Hardy-Weinberg equilibrium, deficits in heterozygotes, linkage disequilibrium, calculations of F_{is} . Inter-population concerns are commonly treated with approaches based on F-stats, assessing gene flow and differentiation between populations or metapopulations, and allowing to detect, with different algorithms, isolation by distance and spatial structuration at various scales.

Developing molecular markers for EM population genetics

First studies of EM population biology widely used multilocus, dominant markers, mainly amplified fragment length polymorphic DNA (AFLP) (Jacobson *et al.*, 1993; de La Bastide *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1998; Sawyer *et al.*, 1999; Gryta *et al.*, 2000; Jany *et al.*, 2002), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) (Redecker *et al.*, 2001; Bruns *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2004), and inter simple sequence repeats (ISSR) (Sawyer *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2005). A major drawback of dominant markers applied to EM fungi is that they are unable to distinguish heterozygous from homozygous loci and therefore, makes it statistically problematic to calculate allele frequencies without assuming Hardy-Weinberg equilibrium or some amount of inbreeding. These markers allow to access to genetic variation through calculation of genetic distances, within and among population. However, since these methods are not based on allele frequencies, there is no population genetics theory developed to specifically test hypotheses regarding genetic structure or quantify gene flow. Hence the use of dominant markers much limited EM fungal population genetics progression.

On the contrary, single locus co-dominant markers make it possible to differentiate homozygous from heterozygous loci. In addition, these markers are often amplified via PCR with more specificity from the fungal genome, so that they can be used directly on mycorrhizae where DNA from plant and other microorganisms co-occur. Co-dominant markers are therefore ideal for analyzing genotypic data from EM fungi. Single locus co-dominant markers also make it easier to compare data between studies since specific loci are amplified. Because of these advantages, these markers like microsatellites or single nucleotide polymorphisms (SNP) are nowadays the most commonly used in all fields of population genetics. But their main disadvantage remains the time and cost

associated with developing and collecting the data, although multiplexing and automated analysis on a DNA sequence can reduce the genotyping time.

For now, many studies of EM genet sizes or population genetics have relied on PCR-RFLP markers, mainly on ITS (Sawyer *et al.*, 1999; Redecker *et al.*, 2001; Jany *et al.*, 2002; Dunham *et al.*, 2003, 2006; Kretzer *et al.*, 2004, 2005; Lian *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008) or IGS regions (Gryta *et al.*, 1997, 2000, 2006; Guidot *et al.*, 1999, 2001, 2002; Hirose *et al.*, 2004; Carriconde *et al.*, 2008) : they are single locus, co-dominant markers, and relatively cheap because of their typing on electrophoresis gels; but they remain less informative than microsatellites and SNPs. However, the use of microsatellites for EM fungi has been retarded by technical difficulties such as DNA contamination since some species are impossible to cultivate or failures at different steps of the library procedure. Moreover, in species where loci have been identified they often exhibit low allelic diversity of the selected loci, either from enriched libraries (Kanchanaprayudh *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2007; Amend *et al.*, 2009) or from ESTs or genome-based approaches (Jany *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2006; Vincenot, personal observation). These obstacles are not specific to EM fungi, but are general features of fungal genomes (Dutech *et al.*, 2007). However, a strong effort of development appears for six years, through the multiplication of studies based on these markers (Kretzer *et al.*, 2004, 2005; Rubini *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2006; Lian *et al.*, 2006; Grubisha *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2007; Roy *et al.*, 2008; Vincenot, unpublished data), or even technical notes proposing new microsatellite locus (Jany *et al.*, 2003; Rubini *et al.*, 2004; Bergemann *et al.*, 2005; Grubisha *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2006; Hitchcock *et al.*, 2006; Jany *et al.*, 2006; Wadud *et al.*, 2006a,b; Hirose & Tokumasu, 2007; Högberg *et al.*, 2009). The recent or soon-awaited EM fungal genomes or EST could represent great sequence databases to be scanned for searching new markers and reduce costs of development, and SNPs already start to be developed thanks to genomic based approaches (Adams *et al.* (2006) on *Amanita* spp.; Labbé *et al.* (2008) on *Laccaria bicolor*; Amend *et al.* (2009) on *Tricholoma matsutake*).

EM population genetics: what we know

Mating systems

The mating system within EM fungi is of central importance in understanding the population biology of these fungi because this elaborate system directly effects who can mate with who, establishes a

potentially longed lived individual that can reproduce for many generations, and can be a driving force in speciation. The mating system under natural field conditions of many basidiomycetes has largely not been studied, but population genetics tools are now available to further understand EM fungal reproduction. Most mating system studies within the Basidiomycetes are based on *in vitro* culture pairings of monokaryons where the formation of intermingling mycelial zones, dikaryons and the formation of clamp connections are used to test compatibility (Dodrick & Anderson, 1989; Rizzo *et al.*, 1995). However, these tests are highly dependent on the *in vitro* conditions and therefore, and may not reflect how dikaryons are established, selected and/or maintained under natural field conditions. For example, introduction of a North American isolate of *L. bicolor* that was fully compatible in the laboratory did not lead to detectable introgression in a European forest, although both indigenous and introduced strains abundantly sporulated on the introduction site (Selosse *et al.*, 1998).

On the contrary, molecular tools can be directly used to test the mating system from fruiting bodies and or mycorrhizal root tips at the population level. Isozyme markers were one of the first molecular markers used to study the genetic variation of EM fungi (Ho & Trappe, 1987; Sen, 1990; Keller, 1992) but no studies that we are aware of have used isozymes to examine mating systems. However, Huss (1996), scoring each isozyme band as an allele, demonstrated high frequencies of heterozygote of the puffball *Lycoperdon pyriforme* in the central United States and suggested that this could be due to outcrossing within the species. Co-dominant PCR based DNA markers alleviate this problem because homo- vs. heterozygosity is easily differentiated within individual dikaryotic tissues. Bonello *et al.* (1998) used 4 random diallelic SSCP loci to test the mating system of *S. pungens*, which was consistent with outbreeding based on significant heterozygous excess. However, they also found that 1.3 to 1.4 % of the basidiospores they examined were binucleate, suggesting that some inbreeding may also be occurring. Bergemann & Miller (2002), using 3 microsatellite loci for *R. brevipes* population associated with different hosts, found an excess of heterozygotes that suggested random mating was occurring in a local population associated with Sitka spruce, whereas a deficiency in heterozygotes supported nonrandom mating in a population associated with lodgepole pine.

Another common way to study the reproductive biology of fungi using molecular markers is by analyzing the association of alleles among loci within a population as exemplified by Burt *et al.* (1996) for the human pathogen *Coccidioides*. For example, LoBuglio & Taylor (2002) could not

reject the null hypothesis of recombination within two populations of *Cenococcum geophilum* based on the analysis of 9 SNPs using this method. Interestingly, however, *C. geophilum* is not known to have a sexual state but Fernández-Toirán and Águeda (2007) have recently claimed to have found sexual fruiting bodies of *C. geophilum*. This was based on similar morphology between the fruiting body and the vegetative structures called sclerotia. However, no single ascospore cultures or molecular methods were used to confirm the identification so this finding remains to be validated. The results of LoBuglio & Taylor (2002) were also recently supported by Douhan et al. (2007) for *C. geophilum* sampled at a small spatial scale but they also found that the results are significantly affected by how species are defined in *C. geophilum sensu lata*. However, Wu et al. (2005) moderated these results through a study of populations of *C. geophilum* on the slopes of the Mount Fuji, characterizing a population with a clear absence of present recombination.

At present, spatial autocorrelation analysis and Mantel tests of isolation by distance, inspired by studies at large scales, are used to get information on the local reproduction of EM fungi. For example, statistically significant but weak spatial autocorrelation was detected in the two smallest distance classes (25 m) of *C. formosus* genets, suggesting limited spore dispersal with potential inbreeding (Dunham et al., 2003, 2006). Carriconde et al. (2008) could reveal a similar pattern of high genetic structuration at a fine scale for *Tricholoma scalpturatum*: a positive spatial autocorrelation limited to 20.3 m or 6.3 m according to the study site and a significative Mantel test of structuration by distance suggested very limited dispersion of the spores.

These studies exploited tools from population genetics to better understand the mating systems of EM fungi. However, it would still be useful to comfort the results by repeating the studies in different ecosystems, and several years.

Population subdivision, gene flow and isolation by distance

Population subdivision and gene flow are intimately linked with the mating system of EM fungi, because understanding the limits at which populations have unrestricted mating and movement of individuals is a central component in the study of population genetic structure. However, still few studies have specifically tested these hypotheses in EM fungi. In fact, few studies at all have been conducted on Hymenomycetes with most fungal studies based on plant pathogenic members of the Ascomycota and Oomycota (Taylor et al., 1999). Notable Basidiomycete genera that have been

studied at the population level are *Armillaria* (Saville *et al.*, 1996; Baumgartner *et al.*, 2009), *Schizophyllum* (James *et al.*, 1999, James & Vilgalys, 2001), *Pleurotus* (Urbanellit *et al.*, 2003; Kay & Vilgalys, 1992), *Mycena* (Boisselier-Dubayle *et al.*, 1996), *Phomytopsis* (Högberg & Stenlid, 1999), *Phellinus* (Kauserud & Schumacher, 2002) and *Agaricus* (Xu *et al.*, 1997).

Even if still scarce, studies on gene flow and spatial structure of EM fungal populations at various scales are growing along with better sampling and improved analyses. Jany *et al.* (2002) studied French populations of *C. geophilum* at a regional scale in five beech stands with various environmental factors, using ITS-RFLP and SCAR markers. They found a high local genetic diversity, and a significant correlation between genetic and physical distances (Mantel's test: $r=0.49$, $P<0.001$ at 250 km) suggesting that spatial distance between the sampling sites play a role in structuring the populations of *C. geophilum*. However, as discussed below, two of the isolates (Am5-1 & N2-10) used in this study were later determined not to be *C. geophilum*, once again highlighting the importance of species identification when analyzing population structure. At a much more restricted distance, Wu *et al.* (2005) showed on the slopes of Mount Fuji the establishment of a population of *C. geophilum* from genotypes originating from another population 5 km away. They thus gave an indication of the minimal capacity of dispersion of the propagules of this species in this peculiar ecosystem, and suggested that avalanches may have been involved with movement of sclerotia of this fungus. Bergemann and Miller (2002) used allelic variation at four microsatellite loci to test for population subdivision of *Russula brevipes* sampled in Douglas-fir, lodgepole pine, and Sitka spruce stands in western North America. High estimates of genetic differentiation suggested that gene flow between subpopulations was limited ($F_{st}=0.434$ at 1500 km). It was also concluded that hosts do not appear to act as significant barriers to gene flow; rather, populations are geographically structured across western North America. Through a later study of *R. brevipes* populations at a very fine scale, Bergemann *et al.* (2006), using on 6 microsatellites loci, detected no significant population differentiation between populations that were from 230 to 1090 m ($\theta_{st}=0.01$) apart. This result suggested genetic exchanges at this stand scale, maybe by animal dispersal. Kretzer *et al.* (2005) also chose to study the fine scale gene flow in populations of *R. vesiculosus* and *R. vinicolor* in stands of Douglas fir in Oregon, with 6 and 7 microsatellite markers, respectively. Low but significant differentiation was detected between plots a distances of 5 km, but they were greater for the more clonal species *R. vesiculosus* ($\theta_{st}=0.078$) than for *R. vinicolor* ($\theta_{st}=0.022$). Kretzer *et al.* (2005) suggested that these low rates of genetic differentiation could be related to mycophagy of the hypogeous fructifications of the *Rhizopogon* sp.

Contrasting to these patterns of population structures at kilometric (*Rhizopogon* sp.) or regional (*C. geophilum*) levels, populations of some EM fungal species show little differentiation by distance. For example, populations of *Laccaria amethystina* have been studied at the French country scale by Roy *et al.* (2008) using 8 microsatellite markers, the IGS1 locus and direct amplification of length polymorphism (DALP), in three sites with various hosts. The highest F_{st} value was 0.029, between two sites separated by 120km, and they could not detect any significant differentiation between populations at distance across 450 km (Mantel's test: $r=0.121$; $P=0.63$) nor evidence of structure by the tree host. Vincenot and collaborators (unpublished data) widened the scope of the study by genotyping samples from 16 European locations (from Northern Spain to Southern Finland) with 8 microsatellites and the IGS1 locus. At this larger spatial scale, the highest F_{st} between pairs of populations was 0.134 across 2000 km, and an absence of differentiation by distance was found from Northern Spain to Southern Finland (Mantel's test: $r=0.313$; $P=0.056$; 2900 km). Such a long-distance dispersal pattern could be explained by the absence of geographical barriers to the dispersion across the sampling area and of host-specificity that would break the continuum of habitats for *L. amethystina*. To a lesser extent, long-distance gene flow also occurs for *Tricholoma matsutake*: Amend *et al.* (2009) studied populations of this species in two *Pinus* and *Quercus* stands in Yunnan, with 5 SNPs. They found a non-significant $F_{st} = 0.01$ between two sites 70 km apart, and an AMOVA showed that intra-site structure accounted for 89% to 100% of genetic variability of the populations. Xu *et al.* (2008) also studied populations of *T. matsutake* at a broader scale from 17 stands in South-Western China using ITS-RFLP and 20 SNPs. The strongest differentiation was between two populations 610 km apart from each other ($F_{st} = 0.232$), and they could detect isolation by distance with a Mantel's test on 1050 km ($r=0.318$, $P=0.028$).

These more recent studies of gene flow between EM fungal populations provides examples of different patterns of geographical structure, either with differentiation by distance visible at a small, kilometric or regional scales (*C. geophilum*, Jany *et al.*, 2002), or at much larger distances (*R. brevipes*, Bergemann et Miller, 2002; *T. matsutake*, Xu *et al.*, 2008; *L. amethystina*, Vincenot *et al.*, unpublished data.). These contrasting patterns of gene flow may reflect diverse types of dispersal, e.g. animal-related as suggested for *Rhizopogon* sp. (Kretzer *et al.*, 2005) or *C. geophilum* (Jany *et al.*, 2002), or long-distance, putatively wind-relayed dispersal. More model species are required to test whether vectors do affect the dispersal range and therefore, population structure. Another important technique would be to use spore traps to establish and quantify gene flow, as well as the

actual dispersal of spores, as has been done for the cosmopolitan saprotroph *Schizophyllum commune* (James & Vilgalys, 2001).

Cryptic species

To study EM fungi, it is essential that one can identify the species of interest as noted above. Anyone who has ever tried to identify mushrooms is familiar with the difficulty of being confident in the identification of specimens to the species level of some genera (i.e., *Cortinarius* spp.). However, even when an identification fits the morphological descriptions of a species, the possibility of cryptic species exists that will confound any population genetic analyses if not recognized by the investigator. During the speciation process, reproductive barriers arise between groups of individuals (Mayr, 1969). The two groups at first share allelic polymorphisms until one of the two groups become fixed for certain alleles whereas the other group remains polymorphic (Avice 1994). Thus, molecular markers can be powerful tools to detect cryptic species or reproductive isolation among morphologically identical fungi. Arguments for cryptic species have been made recently for many species within various fungal genera including phytopathogenic (*Fusarium*, Skovgaard *et al.* (2003); *Stachybotrys*, Cruse *et al.* (2002); *Leptosphaeria*, Vincenot *et al.* (2008a); *Coccidioides*, Koufopanou *et al.* (2001)) and lichenized genera *Physcia* (Mylyys *et al.*, 2001) and *Letharia* (Kroken & Taylor, 2000). Several pathogenic Hymenomycetes phylogenetically close to EM fungi do undergo cryptic speciation, *e.g.* *Armillaria* spp. (Coetzee *et al.*, 2000) or *Heterobasidion annosum* (Garbelotto *et al.*, 1998).

ITS region is the most commonly used marker for fungal species identification, and this region has now been chosen to serve as the barcode for this kingdom (Nilsson *et al.*, 2008). Used as a basic marker for population genetics studies, it allowed researchers to detect unexpected cryptic species among many EM fungi. For example, Sawyer *et al.* (1999), interested in populations of *Cortinarius rotundisporus* in Australian sclerophyll forests, identified 3 distinct ITS-RFLP types, and sequenced this DNA region. They found homologies from 86.2% to 88.4% between the 3 types of ITS sequence, strongly suggesting that three different taxa exist in this single morphospecies. Similarly, Horton (2002), studying ITS variation of several EM fungal species at a local scale, found 3 RFLP types for *Tricholoma flavovirens*, and with posterior sequencing could assess that one type corresponds to a cryptic *Tricholoma* species. Dunham *et al.* (2003) identified 2 ITS-RFLP types of

C. formosus revealing that the ‘Pacific golden chanterelle’ could harbor cryptic species but no formal phylogeny reconstruction was attempted. In contrast, two distinct species of *Russula* based on morphology, *Russula cremicolor* with a white cap and *R. silvicola* with a red cap, shared the same ITS sequences and similar AFLP profiles, indicating that they belong to a single biological species (Redecker *et al.*, 2001).

However, the use of ITS sequence to identify species raises the potential problem that it may not distinguish between closely related, recently arisen species. However, interrupted gene flow can be revealed by other molecular markers, providing insight into potential divergence and the emergence of cryptic speciation. Hitchcock *et al.* (2003) highlighted this within the *Pisolithus tinctorius* species complex using several different molecular markers (ITS, RFLP, RAPD). Kretzer *et al.* (2003) used six polymorphic microsatellites loci added to ITS sequences to investigate the taxonomy of the *Rhizopogon vinicolor* species complex, and distinguished 2 clades suggesting two biological species, *R. vinicolor* and *R. vesiculosus*. A more recent example of the revealing potential of population genetics markers is the non-concordance between several studies of populations of *Laccaria amethystina*. Roy *et al.* (2008) and Vincenot and collaborators (unpublished data), studied French and European populations of this species. They could not amplify 3 loci published by Wadud *et al.* (2006a) in Japan that were developed for *L. amethystina*, but could use the locus *Ll35*, despite the fact that this microsatellite is supposed to be specific to *L. laccata* in Japan (Wadud *et al.*, 2006b). Vincenot *et al.* investigated gene flow between European and Japanese populations of *L. amethystina*, using IGS1 and 8 microsatellite markers and found strong population differentiation (F_{st} Europe-Japan=0.417). A multi-locus phylogeny of *L. amethystina* between European and Japan collections of *L. amethystina* revealed two strongly supported clades between the geographic regions, suggesting an event of speciation by distance across Eurasia (unpublished data).

Cenococcum geophilum is perhaps the most widely distributed and most recognized ectomycorrhizal fungus based primarily on tip morphology. However, recent studies based on both fine scale and global sampling has revealed that *C. geophilum* should actually be thought as a species complex (Douhan & Rizzo, 2005; Douhan *et al.*, 2007, Douhan *et al.* 2007). Based on primarily fine scale sampling and the analysis of four loci, Douhan and Rizzo (2005) found three phylogenetically distinct lineages, or cryptic species, of *C. geophilum* detected at the scale of a single soil sample and between sampling populations 8 meters apart. Using 44 isolates from one of the major lineages found by Douhan and Rizzo (2005), which were subdivided into two well supported subclades, Douhan *et*

al. (2007) analyzed 10 loci and found phylogenetic incongruence between the loci and recombination analyses using six different methods was consistent with recombination. However, most of the incongruence was caused by an apparently reciprocal recombination event between the actin locus and the other loci studied. Lastly, a more global sampling of isolates revealed that phylogenetic resolution of the previously found three lineages broke down and that two isolates used in previous studies (Am5-1 & N2-10) were in fact phylogenetically distinct from all of the other isolates based on the analysis of two loci (Douhan et al. 2007). In conclusion, these results are significant and demonstrate that inferences of population structure are highly dependent upon how *C. geophilum* species are interpreted based both on morphology and genetic data. This potential problem also has implications for other fungal taxa since cryptic species have routinely been found in recent years based on molecular data.

Biogeography

Biogeographic studies are an extension of population structure analyses but tend to focus more on historical processes using phylogenies. Phylogenetic analyses can be used to study historical biogeography to test hypotheses on the origin, dispersal, and extinction of taxa and may be used to explain how geological events, such as Pleistocene glaciations, shaped the distribution of present day species (Myers & Giller 1988; Riddle 1996; Zhou *et al.*, 2006; Keppel *et al.*, 2009). This is a field where plants and animals have been well studied (Malaquias & Reid, 2009; Carrascal *et al.*, 2008; Mummenhoff & Franzke, 2007; Butler *et al.*, 2007), and biogeographical studies of micro-organisms are gaining frequency (Martiny *et al.*, 2006; Ramette & Tiedje, 2007). But little work has been done with fungi in general and hypotheses of biogeographic patterns have been tested for still few genera.

Wu and Mueller (1997) noted the high similarity of macro fungi between eastern Asia and eastern North America, and that the disjunct distributions were usually at or below the species level designation. They noted, however, that these results are strongly biased by species concepts based on morphology. To overcome this, a phylogenetic analysis was conducted on ITS rDNA between eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species. Wu *et al.* (2000) found that morphologically indistinguishable *S. spraguei* specimens from China and North America were paraphyletic whereas a morphologically distinct species, *S. decipiens* from North America, was a sister taxon to the Chinese *S. spraguei*. They also noted that *S. spraguei* was widely distributed and

associated with species of *Pinus* subgenus *Strobos* whereas *S. decipiens* was restricted to the south-eastern United States and was found associated on species of *Pinus* subgenus *Pinus*. They concluded that “...divergence following geographical isolation from a common ancestor followed different paths, with *S. decipiens* changing in morphology, ITS sequence, and host switching to another subgenus while *S. spraguei* only showing sequence divergence.” This study also shows how phylogenetic analyses can be used to address questions of EM host-symbiont evolution and potentially co-speciation since many of the hosts are obligately dependent on mycorrhizal fungi. Chapela and Garbelotto (2004) examined phylogenetic relationships within the economically important ‘Matsutake’ mushrooms, in the genus *Tricholoma*. Based on ITS and AFLP data, they proposed these fungi had an Eocene origin and that the group in western North America that associates with conifers were derived from an angiosperm host ancestor. They also concluded that African and European ‘Matsutake’ mushrooms are the most recent descendants from a westward expansion of these fungi from North America. In Europe, Murat *et al.* (2004) studied the postglacial re-colonization routes of *Tuber melanosporum* from Northern Italy to Northern France and Northern Spain using ITS and SCAR fragments. They concluded that the oldest haplotypes were present in Northern Italy, probably the most frequent of a population which subsisted in a refugee after a drastic bottleneck during the last ice-age (10 000 to 16 000 years BP). *T. melanosporum* would then have recolonized northern regions by a migration through the Po plain and the Alps, following the postglacial route of its host, *Quercus* sp. in France. Rubini *et al.* (2005) investigated the phylogeography of another truffle, *T. magnatum* using 7 microsatellite loci. They also showed that its geographic distribution in Italy follows the postglacial expansion of its host species, *Quercus* sp., *Corylus* sp. and *Tilia* sp., which subsisted in Southern and Central Italy during the last glaciation and then recolonized northern regions. Martin *et al.* (2002) revised the phylogeny of the genus *Pisolithus* using ITS sequences, including new study zones in Australia, Africa and South America. They showed that some lineages of *Pisolithus* occurred in restricted geographical regions, associated with endemic plants, and several lineages introduced from Holarctic to southern Hemisphere with their hosts associated with new regional hosts. In a general conclusion, the lineages of *Pisolithus* are related to the biogeography of their hosts, and can adapt to endemic host species.

Hosaka *et al.* (2008) studied the global biogeography of Hysterangiales using a 5-locus phylogeny. They showed that ectomycorrhizal lineages of Hysterangiales appeared in Australia or eastern Gondwana and were associated with the Myrtaceae. These lineages then expanded to northern hemisphere via long-distance dispersal events, and shifted many times to new hosts according to

their biogeography. However, the authors could not date the apparition of ectomycorrhizal Hysterangiales and therefore could not explain how long-distance dispersal events could occur for these truffle-like basidiomycetes. Halling *et al.* (2008) constructed a phylogeny of the bolete EM fungus *Tylopilus balloui* all around the Pacific based on loci of LSU rDNA and *RpbI*. Their aim was to test 3 hypothesis that could explain its current amphi-Pacific disjunct distribution: (i) a long-distance dispersal, (ii) post-cretaceous migration by land bridges, or (iii) an ancient Pangean distribution. They suggested that hypothesis iii was the most parsimonious conclusion and dated the apparition of this distribution between the divergence of the hymenomycetes and ustilagomycetes and the crown divergence of Basidiomycota. The authors highlighted that EM fungi are likely to have biogeographic patterns specific to their obligately symbiotic life style, and these patterns would then be worth being as largely studied as for saprobic fungi and other organisms.

Molecular phylogenies can also be a powerful tool to biogeography if evolutionary rates can be used to calculate the ages of clades. If an accurate estimate can be calculated, hypotheses that earth events can cause historical speciation can be tested in fungi as has been done for the origin of major groups of organisms (e.g. Berbee & Taylor (1993), on the divergence of animals and fungi; Hedges *et al.*, 1996; Cooper & Penny, 1997). This approach has been used for many fungi, mainly saprobic (Simons *et al.*, 1993) on the radiation of AM Glomeromycota; Hibbett (2001) on *Lentinula*; Geml *et al.* (2006) on *Amanita muscaria*), and Taylor & Berbee (1993, 2001, 2006) proposed several datations along the fungal tree of life. But to date, only few studies apply this approach to ectomycorrhizal models. Den Bakker *et al.* (2007) showed that 5.8S-ITS2 in *Leccinum* sect. *Scabra* evolved according to a molecular clock model. But they could not date the divergence between *L. scabrum* and *L. rotundifoliae*, because they missed a temporal reference to calibrate their phylogeny. Chapela and Garbelotto (2004) calibrated their phylogeny of 'Matsutake', following a molecular clock model, and dated the shift between an angiosperm-associated mycorrhizal ancestor of matsutake to the earliest conifer associates within the 'true Matsutake' at 55 MaBP. Thanks to this calibration, they explain the patterns of vicariance between eastern North America and eastern Asia by a migration through Beringian Strain, and a westward expansion to Europe and Africa. Matheny & Bougher (2006) made a taxonomic and biogeographic description of the recently identified genus *Auritella*, present in Africa and Australia. They calibrated their phylogeny on the node *A. serpentincystis* – *A. geoaustralis*, two species respectively found in Western and Eastern Australia. Their divergence was dated at 15 My, *i.e.* the formation of the Nullarbor Plain on a large part of southern Australia, which formed an edaphic barrier between western and eastern parts of the land.

With this calibration point, Matheny & Bougher (2006) dated the divergence between Australian and African *Auritella* 86 My ago, that is to say in late Cretaceous, and concluded the divergence of the two clades was an event of Gondwanan vicariance. Finally, in their review of the datations of divergence of fungi, Taylor & Berbee (2007) showed that depending on the choice of the fossils for the calibration, datations can be highly variable (from 1808 My to 400 My ago for the radiation divergence Ascomycetes/Basidiomycetes). They concluded that the improvement of the estimates of divergence times will likely depend on the discovery of fossil fungi that would show recognizable shifts in morphology, and thus provide precise calibration points inside the fungal phylogeny.

Indeed, biogeography is an area where considerably more work needs to be done given the ecological importance of fungi as parasites, saprotrophs, decomposers, and as mycorrhizal symbionts. Biogeographical studies will also help to elucidate basic taxonomic confusions that exist in the fungi, especially in the macro-fungi mushroom species. For example, Den Bakker *et al.* (2007) wanted to test if *Leccinum rotundifoliae*, in the section *Scabra* of *Leccinum*, found only in arctic or boreal regions, was a true species, or an arctic ecotype of *L. scabrum*. With 5.8S-ITS2 and *Gapdh* sequences, they could elucidate this taxonomic question, concluding that *L. rotundifoliae* is a true species, restricted to arctic, alpine and boreal regions, and that *L. scabrum* is its sister species.

EM population genetics: future directions

EM population genetics and common mycorrhizal networks (CMN)

We have already emphasized that a discrepancy between above and below ground species composition is common in many of the EM systems studied thus far (see Horton & Bruns, 2001). Therefore, the ability to genotype individual mycorrhizal root tips will be at the forefront of EM population genetics if we are going to better understand the fungi directly involved in the symbiosis. Genetic structure analysis of individuals may also be an indirect way to determine if fungi are involved in a common mycorrhizal network (CMN). It has been well established that a particular species may be found on different host species, and therefore, may be involved in nutrient exchange (Simard & Durall, 2004). However, no one has documented if a single genotype of a species is connected to two plants, even if there is limited molecular evidence for this in the case of some heterotrophic plants (Taylor & Bruns, 1997; Selosse *et al.*, 2002; Tedersoo *et al.*, 2007; Vincenot *et al.*, 2008b). If clonal genotypes are found directly linking plants, then this would provide indirect

evidence of fungal individuals potentially involved in nutrient transfer between hosts. Population genetic analysis of mycorrhizal root tips along with methodologies to trace the movement of nutrients, such as radioactive labels or stable isotopes, will allow these hypotheses to be tested and allow for more precision in determining the importance, if any, of CMNs in natural ecosystems.

Intraspecific population Phylogenetic approaches

Phylogenetic methods have revolutionized modern systematics but traditional methods to estimate interspecific relationships are not suitable for intraspecific data among individuals within a population of a single species (Posada & Crandall, 2001). However, newer networking phylogenetic methods are suitable for intraspecific data and have been used in recent studies to detect recombination, delimit species or modes of speciation, partition population history and structure (see Posada & Crandall, 2001), and will likely be important in future studies of population genetics of EM species. Such methodologies are well suited for EM species because collecting sequence data for specific EM fungi, especially from colonized mycorrhizal root tips, will likely become more common in the future.

To our knowledge, only one EM species has been studied using these approaches but other pathogenic and saprotrophic fungi have been before, which we will give an example of each for illustrative purposes. For the EM ascomycete fungus *Tuber melanosporum*, Murat *et al.* (2004) used ITS haplotype data to study population structure. Nested clade analysis (NCA) revealed geographical association of ITS haplotypes and two old fragmented populations that likely colonized on different sides of the French Massif Central.

Environmental soil sampling

Much attention has been given to the above ground fruiting structures and we have already emphasized the need to sample from EM colonized roots. However, few studies have utilized molecular approaches to study EM fungi from soil samples but these types of studies will likely increase in number and importance in the near future. Guidot *et al.* (2003) used competitive PCR based on a specific region of *H. cylindrosporum* IGS and found that this species could be detected in the soil under fruiting bodies but often not detectable in the absence of a fruiting body a year or more

after their disappearance. This was also supported by the lack of *in vitro* colonization of the host from the same soil samples. These results are also consistent with the previous genet work by Guidot and coworkers we have mentioned previously in which this fungus appears to recolonize from year to year via basidiopores and produces mostly small patches of genotypes. Recently, van der Linde *et al.* (2008) proposed a PCR-based method to detect the mycelia of stipitate hydroid fungi in soil. They developed species-specific primers in the ITS region for 12 hydroid fungal species, with good results of amplification, up to 40 cm away from sporocarps. The development of species-specific primers allows to explore the below-ground distribution of EM fungi, and could also enable one to explore allelic diversity found in the soil. For example, species-specific microsatellites such as those developed for *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* by Kretzer *et al.* (2005), for *L. amethystina* and *L. laccata* by Wadud *et al.* (2006a,b), or for *Pisolithus albus* and *Pisolithus microcarpus* by Hitchcock *et al.* (2003) would allow one to characterize the genetic diversity of below-ground populations, without risk of cross-amplification.

It may also be possible to detect alleles from monokaryons that are colonizing the soil which are not represented in the allelic profiles of fruiting bodies or colonized root tips. Almost nothing is really known about the actual role or prevalence of monokaryotic hyphae within the colonized soil. This aspect of the life cycle of most basidiomycete fungi is a complete mystery and the appropriate molecular tools could really add to our understanding in this respect. Moreover, the role, if any, that monokaryons play as mycorrhizal symbionts is also not known.

New sequencing technologies and 'omics' approaches

Finally, the fast current improvement of sequencing technologies, allowing the sequencing of complete genomes, or thousands of sequences in a few days, may be the next step to greatly improve the accuracy and the quality of population genetics studies of EM fungi. The fundamental use of markers and statistical analyses would not differ, but the genetic resources and means for genotyping could be greatly improved.

Pyrosequencing facilities allow today to sequence complete or parts of fungal genomes, for currently decreasing costs. This facilitated access to genomic resources can, for example, be useful to develop new microsatellites or SNP markers, with primers directly designed from the genome of the species of interest. Even if a single run of pyrosequencing is expensive, it could rapidly balance the time and

money spent in ‘traditional’ strategies of development of molecular markers, i.e., the creation of enriched libraries of microsatellites. Once the targeted loci are chosen, it would then be possible with multiplex identifiers (MIDs) to genotype a great number of loci for an individual in a single run.

The availability of more genomic resources would also be a great opportunity to investigate the functional variation inside populations. Some EM species can show high local genetic diversity that can hardly be explained. For example, Roy *et al.* (2008), using microsatellite markers, could not explain the often-observed genetic diversity of local populations of *Laccaria amethystina* (Gherbi *et al.*, 1999; Fiore-Donno & Martin, 2001; Vincenot *et al.*, unpublished data) by a specialization to the host. To explain local genetic variability of populations of EM fungi, it could be very interesting to investigate on the potential factors effecting genetic structure (hosts species or ages, edaphic or climatic conditions...) by sequencing several targeted genes in all the samples of a population thanks to the new technologies. Phylogenetic studies can also be greatly improved thanks to phylogenomics: as highlighted by Delsuc *et al.* (2005), it is now feasible to sequence the whole genome or the whole transcriptome of non-model species, which means much more nucleotidic variation information to be used on phylogenetic purposes. And last, in terms of studies of diversity, metagenomics could be applied to the exploration of below-ground diversity. For example, Zinger *et al.* (2007) propose to use new sequencing technologies for high-throughput studies of fungal communities by treating high numbers of soil samples where species can be identified with ‘barcodes’ of ITS regions.

Conclusion

Under construction

Acknowledgments

Under construction

References

- Adams RI, Hallen HE, Pringle A. 2006.** Using the incomplete genome of the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera* to identify molecular polymorphisms in the related *Amanita phalloides*. *Molecular Ecology Notes* **6**: 218-220.
- Amend A, Keeley S, Garbelotto M. 2009.** Forest age correlates with fine-scale spatial structure of Matsutake mycorrhizas. *Mycological Research* **113**: 541-551.
- Agerer R. 1991.** Characterization of ectomycorrhiza. *Methods in microbiology* **23**: 23-73.
- Agerer R. 1995.** Index of unidentified ectomycorrhizae. 4. Names and identifications published 1993-1994. *Mycorrhiza* **5(6)**: 449-450.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG. 1998.** Use of molecular methods to estimate the size and distribution of mycelial individuals of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Mycological Research* **102 (3)**: 295-300.
- Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG. 2001.** Distribution and persistence of Australian *Pisolithus* species genets at native sclerophyll forest field sites. *Mycological Research* **108 (5)**: 971-976.
- Baar J, Ozinga WA, Kuyper TW. 1994.** Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps after removal of litter and humus layers in a *Pinus sylvestris* forest. *Mycological Research* **98 (7)**: 726-728.
- Baumgartner K, Grubisha LC, Fujiyoshi P, Garbelotto M, Bergemann SE. 2009.** Microsatellite markers for the diploid basidiomycete fungus *Armillaria mellea*. *Molecular Ecology Resources* **9(3)**: 943-946.
- Berbee ML, Taylor JW. 1993.** Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Canadian Journal of Botany* **71(8)**: 1114-1127.
- Bergemann SE, Miller SL. 2002.** Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal fungus basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytologist* **156**: 313-320.
- Bergemann SE, Miller SL, Garbelotto M. 2005.** Microsatellite loci from *Russula brevipes*, a common ectomycorrhizal associate of several tree species in North America. *Molecular Ecology Notes* **5**: 472-473.
- Bergemann SE, Douhan GW, Garbelotto M, Miller SL. 2006.** No evidence of population structure across three isolated subpopulations of *Russula brevipes* in an oak/pine woodland. *New Phytologist* **170**: 177-184.
- Bonello P, Bruns TD, Gardes M. 1998.** Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist* **138**: 533-542.
- Boisselier-Dubayle MC, Perreau-Bertrand J, Lambourdière J. 1996.** Genetic variability in wild populations of *Mycena rosea*. *Mycological Research*, **100(6)**: 753-758.

- Brown AJ, Casselton LA. 2001.** Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trends in Genetics* **17(7)**: 393-400.
- Brundrett MC. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **54**: 275-304.
- Bruns T, Tan J, Bidartondo M, Szaro T, Redecker D. 2002.** Survival of *Suillus pungens* and *Amanita francheti* ectomycorrhizal genets was rare or absent after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist* **155**: 517-523.
- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. 1996.** Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 770-773.
- Butler DW, Green RJ, Lamb D, McDonald WJF, Forster PI. 2007.** Biogeography of seed-dispersal syndromes, life-forms and seed sizes among woody rain-forest plants in Australia's subtropics. *Journal of Biogeography* **34**: 1736-1750.
- Carrascal LM, Seoane J, Palomino D, Polo V. 2008.** Explanations for bird species range size: ecological correlates and phylogenetic effects in the Canary Islands. *Journal of Biogeography* **35**: 2061-2073.
- Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Mouhamadou B, Gardes M. 2008.** High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and autocorrelation analysis. *Molecular Ecology* **17**: 4433-4445.
- Chapela IH, Garbelotto M. 2004.** Phylogeography and evolution in matsutake and close allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. *Mycologia* **96(4)**: 730-741.
- Coetzee MPA, Wingfield BD, Harrington TC, Dalevi D, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2000.** Geographical diversity of *Armillaria mellea* s. s. based on phylogenetic analysis. *Mycologia* **92(1)**: 105-113.
- Cooke RC, Rayner ADM. 1984.** *Ecology of Saprotrophic Fungi*. Longman Inc, New York.
- Cooper A, Penny D. 1997.** Mass survival of birds across the Cretaceous-Tertiary boundary: molecular evidence. *Science* **275(5303)**: 1109-1113.
- Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. 2002.** Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94(5)**: 814-822.
- Cullings KW, Vogler DR, Parker VT, Finley SK. 2000.** Ectomycorrhizal specificity patterns in a mixed *Pinus contorta* and *Picea engelmannii* forest in Yellowstone National Park. *Applied & Environmental Microbiology* **66**: 4988-4991.
- Dahlberg A. 2001.** Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* **150(3)**: 555-562.
- Dahlberg A, Stenlid J. 1990.** Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytologist* **115**: 487-493.

- Dahlberg A, Stenlid J. 1994.** Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L.: Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist* **128**: 225-234.
- Danielson RM. 1991.** Temporal changes and effects of amendments on the occurrence of sheathing (ecto-) mycorrhizas of conifers growing in oil sands tailings and coal spoil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **35(2)**: 261-281.
- de La Bastide PY, Kropp BR, Piché Y. 1994.** Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytologist* **127**: 547-556.
- Deacon JW, Fleming LV. 1992.** Interactions of ectomycorrhizal fungi. in: mycorrhizal functioning: an integrated plant-fungal process (ed. Allen MF), pp. 249-300. Chapman & Hall, London.
- Delsuc F, Brinkmann H, Philipp H. 2005.** Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics* **6(5)**: 361-375.
- Den Bakker HC, Zuccarello GC, Kuyper TW, Noordeloos ME. 2007.** Phylogeographic patterns in *Leccinum* sect. *Scabra* and the status of the arctic-alpine species *L. rotundifoliae*. *Mycological Research* **111**: 663-672.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Philipps D, Despeghel JP, Vincenot L, Gout L, Rouxel T. 2009.** The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology*, in press.
- Dunham SM, Kretzer A, Pfrender E. 2003.** Characterization of Pacific golden chanterelle (*Cantharellus formosus*) genet size using co-dominant microsatellite markers. *Molecular Ecology* **12**: 1607-1618.
- Dunham MS, O'Dell TE, Molina R. 2006.** Spatial analysis of within-population microsatellite variability reveals restricted gene flow in the Pacific golden chanterelle (*Cantharellus formosus*). *Mycologia* **98 (2)**: 250-259.
- Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T. 2007.** Challenges in microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 933-949.
- Egger KN. 1995.** Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* **73 (S1)**: S1415-S1422.
- El Karkouri K, Selosse MA, Mousain D. 2006.** Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. *FEMS Microbiology and Ecology* **55**: 146–158.
- Fiore-Donno A, Martin F. 2001.** Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist* **152**: 533-542.
- Frankland JC. 1998.** Fungal succession – unraveling the unpredictable. *Mycological Research* **102 (1)**: 1-15.
- Fries N. 1987.** Somatic Incompatibility and Field Distribution of the Ectomycorrhizal Fungus *Suillus luteus* Boletaceae. *New Phytologist* **107**: 735-740.

- Gadgil M, Solbrig OM. 1972.** The concepts of r-K-selection: evidence from wild flowers and some theoretical considerations. *American Naturalist* **106**: 14-31.
- Garbelotto M, Otrosina WJ, Cobb FW, Bruns TD. 1998.** The European S and F intersterility groups of *Heterobasidion annosum* may represent sympatric protospecies. *Canadian Journal of Botany* **76(3)**: 397–409.
- Gardes M, Bruns TD. 1996.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest – above and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* **74**: 1572-1583.
- Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor DL. 2006.** Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology* **15**: 225-239.
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA, Martin F. 1999.** High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* **8**: 2003-2013.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent M-H, Rouxel T. 2007.** Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*, **9 (12)**: 2978-2992.
- Grime JP. 1977.** Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* **111**: 1169-1194.
- Grubisha LC, Kretzer A, Bruns TD. 2005.** Isolation and characterization of microsatellite loci from the truffle-like ectomycorrhizal fungi *Rhizopogon occidentalis* and *Rhizopogon vulgari*. *Molecular Ecology Notes* **5**: 608-610.
- Grubisha LC, Bergemann SE, Bruns TD. 2007.** Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology* **16**: 1811-1812.
- Gryta H, Debaud JC, Effosse A, Gay G, Marmeisse R. 1997.** Fine-scale structure of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune ecosystem forest. *Molecular Ecology* **6**: 353-364.
- Gryta H, Garbaye J, Martin F. 2000.** Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity* **84**: 294-302.
- Gryta H, Carriconde F, Charcosset JY, Jargeat P, Gardes M. 2006.** Population dynamics of the ectomycorrhizal fungal species *Tricholoma populinum* and *Tricholoma sculpturatum* associated with black poplar under differing environmental conditions. *Environmental Microbiology* **8 (5)**: 773-786.
- Guidot A, Lumini E, Debaud JC, Marmeisse R. 1999.** The nuclear ribosomal intergenic DNA as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on *Pinus* roots system. *Applied and Environmental Microbiology* **65 (3)**: 903-909.

- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R. 2001.** Correspondence between genet diversity and spatial distribution between above-and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology* **10**: 1121-1131.
- Guidot A, Gryta H, Gourbière F, Debaud JC, Marmeisse R. 2002.** Forest habitat characteristics affect balance between sexual reproduction and clonal propagation of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Oikos* **99**: 25-36.
- Guidot A, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R. 2003.** Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist* **161**: 539-547.
- Halling RA, Osmundson TW, Neves MA. 2008.** Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological Research* **112(4)**: 437-447.
- Harper JL, Ogden J. 1970.** The reproductive strategy of higher plants. I. The concept of strategy with special reference to *Senecio vulgaris* L. *Journal of Ecology* **58**: 681-689.
- Harper JL. 1977.** *Population Biology of Plant*. Academic Press, London.
- Hedges SB, Parker PH, Sibley CG, Kumar S. 1996.** Continental breakup and the ordinal diversification of birds and mammals. *Nature* **381(6579)**: 226-229.
- Hibbett DS. 2001.** Shiitake mushrooms and molecular clocks: historical biogeography of *Lentinula*. *Journal of Biogeography* **28(2)**: 231-241.
- Hibbett DS, Gilbert LB, Donoghue MJ. 2000.** Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* **407**: 506-508.
- Hirose D, Kikuchi J, Kanzaki M, Futai K. 2004.** Genet distribution of sporocarps and ectomycorrhizas of *Suillus pictus* in a Japanese white pine plantation. *New Phytologist* **164**: 527-541.
- Hirose D, Tokumasu S. 2007.** Microsatellite loci from the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus pictus* associated with the genus *Pinus* subgenus *strobus*. *Molecular Ecology Notes* **7**: 854-856.
- Hitchcock CJ, Chambers SM, Anderson IC, Cairney JWG. 2003.** Development of markers for simple sequence repeat-rich regions that discriminate between *Pisolithus albus* and *P. microcarpus*. *Mycological Research*, **107(6)**: 699-706.
- Hitchcock CJ, Chambers SM, Cairney JWG. 2006.** Development of polymorphic simple sequence repeat markers for *Pisolithus macrocarpus*. *Molecular Ecology Notes* **6**: 443-445.
- Ho I, Trappe JM. 1987.** Enzymes and growth substances of *Rhizopogon* species in relation to mycorrhizal hosts and infrageneric taxonomy. *Mycologia* **79(4)**: 553-558.

- Horton TR, Bruns TD. 1998.** Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytologist* **139**: 331-339.
- Horton TR, Bruns TD, Parker VT. 1999.** Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Canadian Journal of Botany* **77**: 93-102.
- Horton TR, Bruns TD. 2001.** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* **10**: 1855-1871.
- Horton TR. 2002.** Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil* **244**: 29-39.
- Högberg N, Stenlid J. 1999.** Population genetics of *Fomitopsis rosea* – a wood-decay fungus of the old-growth European taiga. *Molecular Ecology* **8**: 703-710.
- Högberg N, Guidot A, Jonnson M, Dahlberg A. 2009.** Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Lactarius mammosus*. *Molecular Ecology Resources* doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02557.x
- Huss MJ. 1996.** Isozyme analysis of population structure and diversity in the puffball species *Lycoperdon pyriforme*. *Mycologia* **88**(6): 977-985.
- Jacobson KM, Miller OK, Turner BJ. 1993.** Randomly Amplified Polymorphic DNA markers are superior to Somatic Incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 9159-9163.
- James TY, Moncalvo JM, Li S, Vilgalys R. 1999.** Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* **157**: 149-161.
- James TY, Vilgalys R. 2001.** Abundance and diversity of *Schizophyllum commune* spore clouds in the Caribbean detected by selective sampling. *Molecular Ecology* **10**: 471-479.
- Jany JL, Garbaye L, Martin F. 2002.** *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist* **154**: 651-659.
- Jany JL, Guidot A, Jonnson M, Dahlberg A, Bousquet J, Khasa DP. 2003.** Microsatellite markers for *Hebeloma* species developed from expressed sequence tags in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology Notes* **3**: 659-661.
- Jany JL, Bousquet J, Gagné A, Khasa DP. 2006.** Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. *Mycological Research* **110**: 51-59.
- Hosaka K, Castellano MA, Spatafora JW. 2008.** Biogeography of *Hysterangiales* (*Phallomycetidae*, *Basidiomycota*). *Mycological Research* **112**: 448-462.

- Kanchanaprayudh J, Lian C, Zhou Z, Hogetsu T, Sihanonth P. 2002.** Polymorphic microsatellite markers of a *Pisolithus* sp. from a *Eucalyptus* plantation. *Molecular Ecology Notes* **2**: 263-264.
- Kausserud H, Schumacher T. 2002.** Population structure of the endangered wood decay fungus *Phellinus nigrolimitatus* (Basidiomycota). *Canadian Journal of Botany* **80**: 597-606.
- Kay E, Vilgalys R. 1992.** Spatial distribution and genetic relationships among individuals in a natural population of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia* **84**(2): 173-182.
- Keller G. 1992.** Isozymes in isolates of *Suillus* Species from *Pinus cembra* L. *New Phytologist* **120**(3): 351-358.
- Keppel G, Lowe AJ, Possingham HP. 2009.** Changing perspectives on the biogeography of the tropical South Pacific: influences of dispersal, vicariance and extinction. *Journal of Biogeography* **36**: 1035-1054.
- Koufopanou V, Burt A, Szaro T, Taylor JW. 2001.** Gene genealogies, cryptic species, and molecular evolution in the human pathogen *Coccidioides immitis* and relatives (Ascomycota, Onygenales). *Molecular Biology and Evolution* **18**: 1246-1258.
- Kranabetter JM. 1999.** The effect of refuge trees on a paper birch ectomycorrhiza community. *Canadian Journal of Botany*. **77**(10): 1523-1528.
- Kretzer AM, Molina R, Spatafora JW. 2000.** Microsatellite markers for the ectomycorrhizal basidiomycete *Rhizopogon vinicolor*. *Molecular Ecology* **9**: 1190-1191.
- Kretzer AM, Luoma DL, Molina R, Spatafor JW. 2003.** Taxonomy of the *Rhizopogon vinicolor* species complex based on analysis of ITS sequences and microsatellite loci. *Mycologia*, **95**(3): 480-487.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW. 2004.** Microsatellite markers reveal the below ground distribution of genets in two species in *Rhizopogon* forming tuberculate ectomycorrhizas on Douglas fir. *New Phytologist* **161**: 313-320.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW. 2005.** Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology* **14**: 2259-2268.
- Kroken S, Taylor JW. 2000.** A gene genealogical approach to recognize phylogenetic species boundaries in the lichenized fungus *Letharia*. *Mycologia* **93**(1): 38-53.
- Labarere J, Noël T. 1992.** Mating type switching in the tetrapolar Basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *Genetics* **131**: 307-319.
- Labbé J, Zhang X, Yin T, Schmutz J, Grimwood J, Martín F, Tuskan GA, Le Tacon F. 2008.** A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytologist* **180** (2): 316-328.

- Lian C, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T. 2006.** *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytologist* **171**: 825-836.
- Liang Y, Guo LD, Ma KP. 2005.** Population genetic structure of an ectomycorrhizal fungus *Amanita manginiana* in a subtropical forest over two years. *Mycorrhiza* **15**: 137-142.
- Lind M, Stenlid J, Olson A. 2007.** Genetics and QTL mapping of somatic incompatibility and intraspecific interactions in the basidiomycete *Heterobasidion annosum* s.l. *Fungal Genetics and Biology* **44**: 1242-1251.
- LoBuglio KE, Taylor JW. 2002.** Recombination and genetic differentiation in the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. *Mycologia* **94**(5): 772-780.
- Malaquias AE, Reid DG. 2009.** Tethyan vicariance, relictualism and speciation: evidence from a global molecular phylogeny of the opisthobranch genus *Bulla*. *Journal of Biogeography* **3**(9): 1760-1777.
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C. 2002.** Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist* **153**: 345-357.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Adams Krumins J, Kuske CR, Morin PJ, Naeem S, Øvreås L, Reysenbach AL, Smith VH, Staley JT. 2006.** Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**(2): 102-112.
- Matheny PB, Bouger ML. 2006.** The new genus *Auritella* from Africa and Australia (Inocybaceae, Agaricales): molecular systematics, taxonomy and historical biogeography. *Mycological Progress* **5**: 2-17.
- Mayr E. 1969.** Populations, species, and evolution – An abridgment of *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts and London, England.
- Milgroom MG. 1996.** Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* **34**: 457-477.
- Milgroom MG, Peever TL. 2003.** Population biology of plant pathogens: the synthesis of plant disease epidemiology and population genetics. **87**(6): 608-617.
- Moncalvo JM, Lutzoni FM, Rehner SA, Johnson J Vilgalys R. 2000.** Phylogenetic relationships of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology* **49**: 278-305.
- Muller LAH, Lambaerts M, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2004.** AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of pioneer populations of *Suillus luteus*. *New Phytologist* **164**: 297-303.
- Muller LAH, Vangronsveld J, Colpaert JV. 2007.** Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and non-polluted habitats. *Molecular Ecology* **16**: 4728-4737.

- Mummenhoff K, Franzke A. 2007.** Gone with the bird: late Tertiary and Quaternary intercontinental long-distance dispersal and allopolyploidization in plants. *Systematics and Biodiversity* **5(3)**: 255-260.
- Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F. 2004.** Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* **164**: 401-411.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008.** Intraspecific *ITS* Variability in the Kingdom *Fungi* as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* **4**: 193-201.
- Peay KG, Bruns TD, Kennedy PG, Bergemann SM, Garbelotto M. 2007.** A strong species–area relationship for eukaryotic soil microbes: island size matters for ectomycorrhizal fungi. *Ecology Letters* **10**: 470-480.
- Phipps CJ, Taylor TN. 1996.** Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia* **88(5)**: 707-714
- Posada D, Crandall KA. 2001.** Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* **16(1)**: 37-45
- Pugh GJF. 1980.** Strategies in fungal ecology. *Transactions of the British Mycological Society* **75**: 1-14.
- Ramette A, Tiedje JM. 2007.** Biogeography: an emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* **53**: 197–207.
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J. 2004.** Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* **82(8)**: 1243–1263.
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD. 2001.** Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita franchetii* in late-stage ectomycorrhizal successions. *Molecular Ecology* **10**: 1025-1034.
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M. 2004.** Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany* **82 (12)**: 1711-1729.
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M. 2004.** Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany* **82(12)**: 1711-1729.
- Riddle BR. 1996.** The molecular phylogeographic bridge between deep and shallow history in continental biotas. *Trends in Ecology & Evolution* **11(5)**: 297-211.
- Rizzo DM, Blanchette RA, May G. 1995.** Distribution of *Armillaria ostoyae* genets in a *Pinus resinosa* - *Pinus banksiana* forest. *Canadian Journal of Botany* **73**: 776-787.

- Rizzo DM, Rentmeester RM, Burdsall HH. 1995.** Sexuality and Somatic Incompatibility in *Phellinus gilvus*. *Mycologia* **87**(6): 805-820.
- Rodrigues KF, Petrini O, Leuchtman A. 1995.** Variability among isolates of *Xylaria cubensis* as determined by isozyme analysis and somatic incompatibility tests. *Mycologia* **87**: 592-596.
- Roy M, Dubois MP, Proffit M, Vincenot L, Desmarais E, Selosse MA. 2008.** Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multi-host symbiont. *Molecular Ecology* **17** (12): 2825-2838.
- Rubini A, Topini F, Riccioni C, Paolocci F, Arcioni S. 2004.** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Molecular Ecology Notes* **4**: 116-118.
- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S. 2005.** Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **71** (11): 6584-6589.
- Saville BH, Yoell H, Anderson JB. 1996.** Genetic exchange and recombination in populations of the root-infecting fungus *Armillaria gallica*. *Molecular Ecology* **5**(4): 485-497.
- Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JW G. 1999.** Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests. *New Phytologist* **142**: 561-568.
- Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JW G. 2001.** Distribution and persistence of *Amanita muscaria* genotypes in Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycological Research* **105**(8):966-970.
- Selosse MA, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1997.** Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in French plantations. *Molecular Ecology* **7**: 561-574.
- Selosse MA, Le Tacon F. 1998.** The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Tree* **13**: 15-20.
- Selosse MA, Martin F, Le Tacon F. 1998.** Survival of an introduced ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* strain in a European forest plantation confirmed by mitochondrial analysis. *New Phytologist* **140**: 753-761.
- Selosse MA, Martin F, Bouchard D, Le Tacon F. 1999.** Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. Discrete genotypes in a Douglas fir plantation. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (5): 2006-2014.
- Selosse MA, Martin F, Le Tacon F. 2001.** Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir. *Mycological Research* **105** (5): 524-531.
- Selosse MA, Weiß, Jany JL, Tillier A. 2002.** Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) L.C.M. Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**, 1831-1844.

- Selosse MA. 2003.** Founder effect in a young *Leccinum duriusculum* (Schultzer) Singer population. *Mycorrhiza* **13**: 143-149.
- Simard SW, Durall DM. 2004.** Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* **82(8)**: 1140–1165.
- Smith SE, Read DJ. 2009.** Mycorrhizal Symbiosis, 3rd edn. Academic Press, London.
- Skovgaard K, Rosendahl S, O'Donnell K, Nirenberg HI. 2003.** *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Mycologia* **95(4)**: 630-636.
- Taylor DL, Bruns TD. 1997.** Population, habitat and genetic correlates of mycorrhizal specialization in the 'cheating' orchids *Corallorhiza maculata* and *C. mertensiana*. *Molecular Ecology* **8**: 1719-1732.
- Taylor JW, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V. 1999.** The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 126-146.
- Taylor JW, Berbee ML. 2006.** Dating divergences in the fungal tree of life: review and new analyses. *Mycologia* **98(6)**: 838-849.
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse MA. 2007.** Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for myxotrophy in Pyrolae. *Oecologia* **151**: 206-217.
- Van der Linde S, Alexander I, Anderson I. 2008.** A PCR-based method for detecting the mycelia of stipitate hydroid fungi in soil. *Journal of Microbiological Methods*. **75**: 40-46.
- Vincenot L, Balesdent M-H, Li H, Barbetti MJ, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T. 2008a.** Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathology* **98**: 321-329.
- Vincenot L, Tedersoo L, Richard F, Horcine H, Kõljalg U, Selosse MA. 2008b.** Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, in two Estonian boreal forests. *Mycorrhiza* **19(1)**: 15-25.
- Visser S. 1995.** Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**: 389-401.
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Ishida TA, Hogetsu T. 2006a.** Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes* **6**: 130-132.
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Ishida TA, Hogetsu T. 2006b.** Isolation and characterization of five microsatellite loci in an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Molecular Ecology Notes* **6**: 700-702.
- Wadud MA. 2007.** Reproduction ecology of pioneer ectomycorrhizal fungi, *Laccaria amethystina* and *L. laccata*, in the volcanic desert on Mount Fuji. PhD thesis. Tokyo, Japan: the University of Tokyo.
- Worrall JJ. 1997.** Somatic Incompatibility in Basidiomycetes . *Mycologia* **89(1)**: 24-36.

- Wu QX, Mueller GM, Lutzoni FM, Huang YQ, Guo SY. 2000.** Phylogenetic and biogeographic relationships of Eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species (fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **17(1)**: 37-47.
- Wu B, Nara K, Hogetsu T. 2005.** Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers. *New Phytologist* **165**: 285-293.
- Xu J, Kerrigan RW, Callac P, Horgen PA, Anderson JB. 1997.** Genetic structure of natural populations of *Agaricus bisporus*, the commercial button mushroom. *Journal of Heredity* **88**: 482-488.
- Xu J, Sha T, Li YC, Zhao ZW, Yang ZL. 2008.** Recombination and genetic differentiation among natural populations of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* from Southwestern China. *Molecular Ecology* **17**: 1238-1247.
- Yun W, Hall IR. 2004.** Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* **82**: 1063-1073.
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T. 2000.** Genet distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. *Journal of Plant Research* **113**: 365-374.
- Zhou Z, Miwa M, Matsuda Y, Hogetsu T. 2001.** Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei*. *Journal of Plant Research* **114**: 179-185.
- Zhou Z, Yang X, Yang Q. 2006.** Land bridge and long-distance dispersal – Old views, new evidence. *Chinese Science Bulletin* **51(9)**: 1030-1038.
- Zinger L, Gury J, Giraud F, Krivobok S, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA. 2007.** Improvements of Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism methods in microbial ecology: toward a high-throughput method for microbial diversity studies in soil. *Microbial Ecology* **54(2)**: 203-216.

CHAPITRE II

Le genre *Laccaria* comme modèle d'étude des populations de
champignons ectomycorhiziens

II.1. Brève description de la biologie de l'espèce

Les laccaires (*Laccaria* spp.) sont des champignons Basidiomycètes, de la famille des Tricholomatacées (ordre des Agaricales). C'est un **genre cosmopolite**, présent sur tous les continents excepté l'Antarctique, et dont certaines espèces sont très communes. La plupart des espèces de *Laccaria* s'associent en ectomycorhizes à de nombreuses espèces d'arbres, Gymnospermes ou Angiospermes.

Greg Mueller, du *Field Museum* de Chicago, a consacré de nombreux travaux à la taxonomie des différentes espèces de *Laccaria*. Il souligne une caractéristique du genre : sa relative simplicité morphologique (Figure 5) couplée à une forte plasticité phénotypique, rendant certains taxons difficiles à identifier, surtout ceux présentant une large aire de répartition géographique (Mueller 1992). Cette rareté de caractères morphologiques fiables a largement compliqué les tentatives de classification du genre ; le nombre d'espèces de *Laccaria* reconnues varie d'un auteur à l'autre (18 selon Singer 1986, 43 selon McNabb 1972 !), et la définition de leur aire géographique reste également peu claire (www.fieldmuseum.org).

Le cycle biologique de *Laccaria* spp. suit celui général, assez simple, des Basidiomycètes ectomycorhiziens, alternant haplophase (courte) et diplophase (longue ; Chapitre I). Les basidiospores haploïdes germent et produisent un mycélium monocaryotique, autoincompatible par la présence de deux facteurs d'incompatibilité sexuelle complexes, présentant jusqu'à 45 allèles (Encadré 2 ; Kropp et Mueller 1999 ; Niculita-Hirzel *et al.* 2008). La fusion de deux mycéliums compatibles forme un mycélium dicaryotique, souterrain. Cet appareil végétatif peut croître indéfiniment dans le sol, se fractionner et refusionner de nombreuses fois. Dans des conditions environnementales favorables, le mycélium engendre un carpophore diploïde épigé, abritant les basides dans lesquelles sont produites les basidiospores haploïdes par division méiotique (Encadré 2). À maturité du carpophore, les basidiospores tombent en « pluie de spores », ou sont dispersées par des mycophages ou par le vent. La croissance indéfinie du mycélium permet sa survie au-delà de la fructification, et la cohabitation de plusieurs générations.



Figure 6 : Macro- et micro-morphologie d'espèces communes de *Laccaria* spp. Les principaux caractères systématiques sont (i) la présence de pigments violets sur le stipe, le chapeau, les lamelles et le mycélium, (ii) le nombre de stérigmates des basides, (iii) la taille et l'ornementation des basidiospores. En haut, carpophores de *L. amethystina* (a), *L. bicolor* (b) et *L. laccata* (c). En bas, basidiospores échinulées (e, f, g) des trois mêmes espèces (échelle : barre = 1µm). (Photos : a, M. Lecomte ; b, JP. Maurice ; d, e, f, g, G. Mueller)

La symbiose ectomycorhizienne est généralement produite par le mycélium dicaryotique, colonisant les **racines fines** de l'hôte (Figure 6). La morphologie de la mycorhize évolue au cours du temps, avec les vieillissements des racines et des structures fongiques, et la mycorhize est renouvelée de façon saisonnière à partir de l'inoculum de **mycélium persistant** dans le sol ou sur les racines plus anciennes. La longévité de la mycorhize est de quelques dizaines de jours (Smith et Read 2009), alors que la durée de vie des individus, potentiellement de plusieurs années, reste méconnue.

Les mycorhizes de *Laccaria* sp. sont abondantes à différents stades de la succession forestière, et leur écologie permet de signer les étapes du cycle sylvigénétique. En effet, certaines espèces sont considérées comme **pionnières**, car leurs carpophores sont souvent trouvés sur des sites

perturbés et dans des forêts jeunes, mais pas ou peu dans des forêts matures. *Laccaria bicolor* est par exemple considéré comme une espèce ectomycorhizienne pionnière, liée à l'établissement des premiers stades forestiers (de la Bastide *et al.* 1994 ; Baar *et al.* 1994 ; Selosse *et al.* 1998, 1999). *Laccaria* cf. *montana* est l'une des rares (quatre) espèces fongiques présentes sur la zone de retrait du Glacier Lyman (Washington, États-Unis) libérée depuis moins de 40 ans (Jumpponen *et al.* 2002) ; *L. proxima*, *L. ohiensis* sont considérés également comme des espèces pionnières (Mueller 1992 ; Salusso *et Morana* 1995). Mais certaines espèces du genre *Laccaria* sont considérées comme « **multi-stades** » (Durall *et al.* 1999), se rencontrant à différents âges de la forêt. *L. amethystina* se rencontre dans des forêts de divers degrés de maturité : au Japon, elle fait partie des espèces pionnières, participant à la recolonisation des pentes du Mont Fuji en s'associant notamment à *Salix reinii* (Nara *et al.* 2003) ; l'espèce présente aussi une stratégie de colonisation rudérale en forêts plus matures (Gherbi *et al.* 1999 ; Fiore-Donno *et Martin* 2001) ; mais elle est associée à des arbres d'âge très variables en forêts tempérées (de 15 à 200 ans, Gherbi *et al.* 1999 ; Fiore-Donno *et Martin* 2001 ; Roy *et al.* 2008 ; Vincenot *et al.* en préparation), suggérant une capacité d'adaptation à la maturité de ses hôtes, et à la compétition avec les autres nombreuses espèces des communautés ectomycorhiziennes de stade tardif. *L. laccata*, *L. fraterna*, *L. montana*, *L. nobilis* sont d'autres exemples d'espèces multi-stades du genre (Mueller 1992).

Au-delà de leur importance écologique, la fréquence et la relative simplicité d'identification de certains *Laccaria* (*L. laccata* et *L. amethystina* sont communs en forêts tempérées) et leur large aire de répartition (transcontinentale pour *L. bicolor*, *L. amethystina*, *L. fraterna*, *L. laccata*, *L. tortilis*...) font de ce genre un bon modèle de laboratoire, mais aussi de génétique des populations en forêt, parfois artificielles pour *L. bicolor*, naturelles pour *L. amethystina*.

II.2. Le genre *Laccaria* en laboratoire, un modèle de biologie ectomycorhizienne

II.2.1. Première période : *Laccaria* comme modèle biologique ectomycorhizien

Au-delà des travaux mycologiques de taxonomie des espèces de *Laccaria*, certaines espèces de *Laccaria* ont fait l'objet de nombreuses études en laboratoire et en milieux naturels, aboutissant à la description fine de leur biologie. Ce genre a été utilisé comme modèle dans divers domaines de la biologie fongique et des mycorhizes associées, tels que :

- la cytologie fongique (*Laccaria* sp., Mueller et Ammiratti 1993, Mueller *et al.* 1993)
- la germination des spores (*L. laccata*, Fries 1977, 1983) et la description des systèmes d'incompatibilité somatique et de types sexuels fongiques (*L. laccata*, Fries 1983 ; *Laccaria* sp., Fries et Mueller 1984 ; *L. bicolor*, Kropp et Fortin 1988, *L. laccata*, Doudrick et Anderson 1989)
- les méthodes de culture *in vitro* (Davis et Jong 1976 ; Fries et Mueller 1984 ; Kropp et Fortin 1986 ; Munzenbürger *et al.* 1992)
- la structure anatomique de la mycorhize et du réseau de Hartig et leur formation (*L. bicolor* sur *Betula alleghaniensis* et *Pinus resinosa*, Massicotte *et al.* 1989 ; *L. amethystea* sur *Betula* sp., Cuvelier 1991 ; *L. amethystina*, Raidl et Agerer 1992 ; *L. laccata* sur *Pinus patula*, Mohan *et al.* 1993 ; *L. bicolor* sur racines de *Pseudotsuga menziesii*, Lumley *et al.* 1995).

Ces connaissances fondamentales sur la biologie des laccaires en laboratoire sont venues compléter la compréhension de l'écologie et de la reproduction du genre en milieu naturel. La possibilité de culture de certaines espèces, notamment *L. bicolor* et *L. laccaria*, permet de les manipuler en laboratoire et de propager des souches d'intérêt. Cette maîtrise à la fois en forêt et au laboratoire a fait de *Laccaria* un genre privilégié pour des études ultérieures, servant de modèle fongique ectomycorhizien pour de nouvelles approches appliquées, moléculaires ou fonctionnelles.

II.2.2. Deuxième période : 1980 – 1990, les mycorhizations contrôlées

La maîtrise de la culture de souches et de manipulations en laboratoire de certaines espèces ont permis à différents scientifiques de proposer une application de ces connaissances, et de développer avec succès les **inoculations contrôlées** de *L. bicolor* dans des démarches de reforestation.

L'importance des champignons ectomycorhiziens dans les écosystèmes forestiers, et notamment dans la nutrition des arbres est reconnue depuis plus d'un siècle (Frank 1885), et la maîtrise des assemblages mycorhiziens, influant sur la croissance des arbres, permettrait de maîtriser la production forestière. À défaut de pouvoir réellement maîtriser les communautés mycorhiziennes, la mycorhization de plants de pépinière avant leur plantation dans des forêts renouvelées ou de nouvelles plantations par des souches ectomycorhiziennes sélectionnées accroît leur potentiel de développement. En effet, la mycorhization contrôlée accroît la vitesse de croissance des plants en favorisant leur nutrition dès la pépinière. L'objectif des mycorhizations est justement ce gain précoce de croissance, permettant une transplantation plus rapide des plants de la pépinière au milieu à reboiser. Cette croissance rapide des plants favorise leur compétitivité dans leur nouveau milieu, et facilite aussi les itinéraires techniques forestiers, notamment la lutte contre les adventices (Le Tacon *et al.* 1998). Les souches ectomycorhiziennes inoculées protègent aussi les jeunes plants des stress environnementaux et des attaques de pathogènes des racines dès la pépinière (Gagnon *et al.* 1991 ; Garbaye *et al.* 1988). D'autre part, l'inoculation de souches ectomycorhiziennes sélectionnées assure la colonisation rapide des plants par un partenaire ectomycorhizien persistant lors de sa transplantation en forêt ; elle pourrait être particulièrement utile à la reforestation de milieux où les sols sont appauvris en inoculum ectomycorhizien (Diaz et Roldan 2000 ; Teste *et al.* 2004).

Suite au développement des techniques d'inoculation (*e.g.* Marx *et al.* 1982 ; Duponnois et Garbaye 1991 ; Dighton *et al.* 1993 ; Frey-Klett *et al.* 1999), des stratégies et des parcours techniques d'inoculation en pépinière ont rapidement été proposées pour maximiser l'efficacité des mycorhizations contrôlées. Leur succès dépend en effet de nombreux facteurs, notamment le mode d'inoculation (en pellets, en solution) et la survie de l'inoculum lors de la transplantation (Grove et Le Tacon 1993 ; Brundrett *et al.* 1996 ; Généré *et al.* 2004). Pour

pouvoir réaliser ces mycorhizations, il faut sélectionner des souches fongiques qui améliorent effectivement les performances des arbres inoculés, et qui puissent s'adapter à des conditions environnementales variables entre pépinières, ou entre la pépinière et la forêt (Kropp et Langlois 1990 ; Grove et Le Tacon 1993). *Pisolithus tinctorius* est la première espèce ectomycorhizienne utilisée avec succès, pour sa compétitivité et son adaptabilité aux stress environnementaux (Marx et Bryan 1969 ; Molina 1979 ; Marx *et al.* 1982). Mais *P. tinctorius* n'est pas adapté à toutes les situations, et d'autres champignons ectomycorhiziens ont été sélectionnés –avec des succès variables– pour des inoculations contrôlées, telles que *Rhizopogon* sp., *Hebeloma* sp., *Suillus* sp. ou *Laccaria* sp. (Smith et Read 2009).



Figure 7 : Carpophores de *Laccaria bicolor* S238N associé à des plantules de *Pseudotsuga menziesii* (Photo : Vairalles/INRA)

Chez *Laccaria* sp., diverses souches ont été testées pour leur potentiel de mycorhization de plantes de pépinières (Stack *et al.* 1975 ; Molina 1982 ; Molina et Chamard 1983 ; Gagnon *et al.* 1991, 1995 ; Thomson *et al.* 1994). Certaines ont été sélectionnées pour être inoculées commercialement, comme la souche nord-américaine *L. bicolor* S238N, aujourd'hui la plus utilisée en inoculation et comme modèle en laboratoire. L'inoculation cette souche au sapin de Douglas (*P. menziesii* ; Figure 7) peut accroître significativement la hauteur, et dans des conditions environnementales favorables, doubler le volume de bois de l'arbre 6 ans après la transplantation (Le Tacon *et al.* 1988).

L'application des mycorhizations contrôlées de *Laccaria* spp. a créé le besoin de suivre les **souches introduites** et les populations naturelles de ces espèces, afin de (i) évaluer la persistance des souches introduites, (ii) caractériser la sensibilité des populations indigènes à l'introduction de souches sélectionnées et (iii) quantifier l'impact des souches introduites sur l'écosystème naturel ou en voie de reforestation. Pour mener ces suivis, des outils moléculaires

ont été mis au point (Gardes *et al.* 1991 ; Henrion *et al.* 1992, 1994 ; Tommerup *et al.* 1995 ; Selosse *et al.* 1998, 1999 ; Weber *et al.* 2002 ; Jany *et al.* 2006), permettant d'accéder au génotype des individus et de repérer les souches introduites.

Les études successives, à différents termes après l'implantation en forêts de plants mycorhizés, montrent la capacité de persistance de souches de *L. bicolor* inoculées, après transplantation : au moins 2,5 ans sur des plants de *Picea mariana* (Buschena *et al.* 1992), 12 ans sur *P. menziesii* (Henrion *et al.* 1994 ; Selosse *et al.* 1999 ; Di Battista *et al.* 2002), 3 ans sur *Picea abies* (de la Bastide *et al.* 1994).

Des souches de *L. bicolor* S238N inoculées en pépinière ont été suivies depuis la pépinière jusqu'en forêt après leur transplantation, afin d'évaluer leur persistance sur les racines des arbres inoculés et leur dissémination dans leur milieu d'introduction. Henrion *et al.* (1994) ont montré, en génotypant des mycorhizes et des carpophores à l'aide du locus IGS de l'ARNr (Encadré 2), que les arbres mycorhizés artificiellement par S238N restaient exclusivement colonisés par cette souche ou par ses descendants sexués pendant 1,5 ans après l'inoculation, alors que des arbres non inoculés étaient colonisés par des souches indigènes de différentes espèces. Cette étude montre la capacité compétitive de la souche exotique S238N (elle est nord-américaine) par rapport aux souches indigènes. L'étude en forêt de la persistance de S238N inoculé à des plants de *P. menziesii* (par suivi de fructifications, Selosse *et al.* 1998) confirme ces observations, à plus long terme. Cette souche de *L. bicolor* inoculée peut persister au moins 10 ans dans le sol forestier, associée aux racines de ses hôtes, sans s'hybrider avec des souches indigènes. La distribution spatiale des génets de S238N montre leur persistance sans extension depuis les racines inoculées, vraisemblablement par compétition avec les souches indigènes. Ces études mettent en évidence la stabilité de la souche *L. bicolor* S238N, qui est compétitive et persistante, mais ne semble pas envahir son milieu forestier d'introduction. *L. bicolor* est actuellement effectivement utilisé pour des inoculations : des plants mycorhizés d'essences variées (*Fagus sylvatica*, *Larix decidua*, *Pinus* spp., *P. menziesii*, *Quercus* spp. par exemple) sont commercialisés par diverses pépinières.

II.2.3. Troisième période : étude in vitro des mécanismes et de l'interaction ectomycorhizienne

Parallèlement à l'application des recherches sur *L. bicolor* aux mycorhizations contrôlées en foresterie, le genre *Laccaria* a été utilisé comme modèle pour étudier les mécanismes physiologiques et génétiques de la mise en place de la symbiose ectomycorhizienne.

Les microorganismes du sol et de la rhizosphère en particulier peuvent influencer la mise en place et le développement des mycorhizes (Fitter et Garbaye 1994). L'association entre *P. menziesii* et *L. laccata* a permis de documenter le rôle des bactéries présentes dans la rhizosphère, qui peuvent favoriser l'établissement puis le développement de la mycorhize entre le partenaire fongique et sa plante hôte (Garbaye *et al.* 1990 ; Duponnois et Garbaye 1991 ; Garbaye 1994). Ces bactéries favorables (« **bactéries auxiliaires de mycorhization** ») et leurs interactions avec *Laccaria* ont ensuite été plus précisément étudiées pour leur potentielle application couplée aux mycorhizations artificielles (Duponnois *et al.* 1993 ; Frey-Klett *et al.* 1997 ; Brulé *et al.* 2001). Au-delà des objectifs de recherche appliquée, les relations entre *Laccaria* sp. et les composantes de la rhizosphère ont été étudiées dans un contexte d'études écologiques d'interactions tripartites, débouchant sur la sélection de biovars de *Pseudomonas fluorescens* dans la rhizosphère de *P. menziesii* par *L. bicolor* (Frey *et al.* 1997). Ces travaux, applicables aux démarches de mycorhization contrôlée, ont initié l'étude des bactéries auxiliaires chez d'autres modèles ectomycorhiziens (*Pisolithus* sp., Founoune *et al.* 2002 ; *Tuber borchii*, Sbrana *et al.* 2002 ; *Suillus granulatus*, Rincon *et al.* 2005).

Parallèlement, de nombreuses études se sont consacrées à la **nutrition** des champignons ectomycorhiziens en laboratoire, associés ou non à leur plante-hôte, en utilisant *Laccaria* sp. comme modèle fongique. Wallander et Nylund (1991, 1992) se sont par exemple intéressés aux effets de l'azote et du phosphore sur la production mycélienne et la croissance associée de la plante-hôte. Ces travaux montrent l'inhibition du développement fongique en cas d'excès azoté, tandis que l'effet du phosphate est bénéfique ; les auteurs replacent ces résultats dans un contexte forestier, mentionnant le déclin possible des associations ectomycorhiziennes lié au dépôt d'azote atmosphérique et à la fertilisation forestière. La plupart des travaux sont consacrés plus particulièrement au métabolisme du partenaire fongique, notamment à la nutrition phosphatée (Kropp 1990 ; Nguyen *et al.* 1992) et azotée (Ahmad *et al.* 1990 ;

Martin *et al.* 1994 ; Yamanaka 1999 ; Kreuzwieser *et al.* 2000) chez *L. bicolor*. Des études enzymatiques associées ont permis d'explorer le fonctionnement de ces voies métaboliques, comme la régulation de l'assimilation de l'azote par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-glutamate déshydrogénase (*NADP-GDH*) (Brun *et al.* 1992 ; Lorillou *et al.* 1996) chez *L. bicolor*. Un objectif commun de ces diverses études est de comprendre le cycle des nutriments, du sol à la plante, en passant par le champignon ectomycorhizien. Par des expérimentations *in vitro*, elles apportent des clés pour la compréhension du métabolisme du partenaire fongique, faute de pouvoir étudier ces mécanismes dans le cadre d'une association mycorhizienne en milieu forestier.

L. laccata et *L. bicolor* ont également été utilisés *in vitro* comme modèles d'étude des mécanismes impliqués dans la mise en place et le fonctionnement de l'interaction mycorhizienne. Ces travaux concernent d'abord la **physiologie** de la formation de l'interaction (par exemple l'adhésion à la cuticule racinaire de *P. abies* par *L. amethystea* puis sa pénétration, Kotke 1997), puis plus précisément les processus physico-chimiques impliqués. Karabaghli-Degron *et al.* (1998) ont par exemple montré que l'auxine produite par *L. bicolor* S238N stimulerait la rhizogenèse et la colonisation du cortex racinaire de *P. abies*. Des gènes de signalisation impliqués dans les premiers stade de la formation de la mycorhize entre *L. bicolor* et sa plante-hôte ont ensuite été caractérisés (Kim *et al.* 1999 ; Sundaram *et al.* 2001). Enfin, diverses activités enzymatiques impliquées dans le fonctionnement de la mycorhize établie ont été explorées (Brun *et al.* 1994 ; Bedell *et al.* 1995 ; Balasubramian *et al.* 2002 par exemple). L'ambition de ces différents travaux était de décrire finement le fonctionnement de la machinerie cellulaire d'un modèle fongique, impliqué dans une interaction biotique. Grâce au développement des outils de biologie moléculaire, ces études fonctionnelles de l'interaction ectomycorhizienne ont rassemblé une vaste quantité de connaissances sur les mécanismes de mise en place, de signalisation et de fonctionnement de la mycorhize. Cependant, ces **connaissances** sont restées **fragmentaires**, concentrées sur des fonctions non directement reliées entre elles (activités ATPase, glutamine synthétase, NADP-GDH...). Elles permettent de comparer ponctuellement les activités biologiques de différentes espèces modèles, mais restent difficiles à organiser entre elles pour dégager une image claire de la biologie de l'organisme fongique dans son intégralité, et de son interaction avec son hôte. Un moyen potentiel d'atteindre un niveau de compréhension supérieur des processus biologiques du

champignon mycorhizien et de sa symbiose est alors d'accéder à des ressources génétiques plus étendues.

II.2.4. Les années 2000 : l'ère de la génomique

La mise en place et le développement de la symbiose ectomycorhizienne impliquent des gènes multiples, jouant un rôle dans une suite complexe d'étapes interdépendantes, participant à la communication entre les partenaires fongique et végétale depuis leur première interaction jusqu'à la régulation de leurs échanges nutritifs (Smith et Read 2009). Suite à la disponibilité de grandes quantités d'information fonctionnelles sur la physiologie de l'interaction, un nouvel objectif est de relier ces processus à une information génétique, pour continuer à compléter efficacement l'assemblage des nombreux gènes impliqués dans les fonctions vitales du champignon ectomycorhizien et l'interaction mycorhizienne.

Le premier accès à l'information génomique en masse s'est fait *via* l'expression génomique. Courty *et al.* (2009), par exemple, ont eu recours à des **puces d'expression** transcriptomique dans des ectomycorhizes et des carpophores prélevés sur des plants de *P. menziesii* inoculés en pépinière par *L. bicolor* S238N et du mycélium de cette même souche cultivé *in vitro*, pour caractériser la diversité et l'évolution des familles géniques de laccases et ferroxidases.

L. bicolor est le premier champignon ectomycorhizien dont le génome ait été entièrement séquencé. Martin *et al.* ont publié en 2008 un assemblage de 65 millions de bases (Mb), soulignant les multiples promesses qu'il offrait : « *L'identification des facteurs primaires régulant le développement symbiotique et l'activité métabolique ouvrira la porte de la compréhension du rôle des ectomycorhizes dans le développement et la physiologie de la plante, permettant d'explorer l'importance écologique complète de cette symbiose* ».

Le **séquençage** du génome de *L. bicolor* représente en effet une opportunité pour comprendre les processus d'interactions entre les partenaires ectomycorhiziens fongiques et leurs plantes hôtes. La ressource génomique de *L. bicolor* complète déjà les recherches fonctionnelles préexistantes, en explorant plus avant la génétique des processus de formation et de fonctionnement de l'interaction plante-champignon ectomycorhizien. Par exemple, Lucic *et al.* (2008) se sont intéressés au transportome de l'azote chez *L. bicolor*, en associant à des puces

d'expression génomique une approche d'exploration *in silico* de la séquence génomique, permettant de repérer au moins 128 gènes modèles impliqués dans le transfert de composés azotés. De manière comparable, Deveau *et al.* (2008) ont couplé les approches transcriptomique et génomique pour construire un inventaire des voies métaboliques impliquées dans le métabolisme primaires des sucres dans le mycélium, les ectomycorhizes et les carpophores de *L. bicolor*. D'après Martin *et al.* (2008), l'exploration du génome de *L. bicolor* a permis de prédire 20000 gènes codant des protéines, et de révéler un grand nombre de transposons et de séquences répétées, et de très nombreuses petites protéines sécrétées, vraisemblablement impliquées dans l'établissement de la mycorhize. Le génome séquencé de *L. bicolor* apparaît donc comme une ressource immense et prometteuse pour mener plus avant l'exploration fonctionnelle de la biologie du genre *Laccaria* et de son interaction ectomycorhizienne. Selon Martin et Nehls (2009), la plupart des gènes dont la transcription est induite par la symbiose codent des protéines aux fonctions inconnues, n'ayant pas d'homologues dans les modèles fongiques communément étudiés, et qui restent à identifier. Pour exploiter toutes ces informations, au-delà des analyses *in silico*, il reste nécessaire de continuer à coupler à la génomique des approches de protéomique et transcriptomique en laboratoire et de consacrer du temps à la caractérisation fonctionnelle *in vitro* des gènes aux fonctions encore inconnues.

La séquence complète du génome ouvre aussi la voie à l'exploration de questions évolutives, concernant les champignons en général, et les ectomycorhiziens en particulier. Une approche de génomique comparative, recourant aux séquences génomiques de *L. bicolor* et d'autres champignons, pourrait permettre d'étudier les fonctions de familles de protéines non encore identifiées, et de s'intéresser à l'**évolution des familles géniques** au sein des différents taxons fongiques, en relation avec leurs écologies. La comparaison avec d'autres génomes fongiques a révélé un nombre élevé de gènes chez *L. bicolor*, permettant un mode de vie symbiotique mais également des capacités saprophytiques (Deveau *et al.* 2009 montrent par exemple que les voies de biosynthèse et de catabolisme des sucres chez *L. bicolor* sont semblables à celles de basidiomycètes saprotrophes), et témoignant potentiellement de l'évolution de l'espèce (Martin et Nehls 2009).

Enfin, le génome séquencé de *L. bicolor* représente une ressource immense pour le développement de **marqueurs génétiques** spécifiques à *L. bicolor* ou transposés à d'autres

espèces, par exemple pour les études de génétique fonctionnelle en laboratoire, mais aussi pour caractériser le polymorphisme des populations en écosystèmes naturels (Martin et Selosse 2008). En effet, l'exploration de la structure du génome a révélé de nombreux loci microsatellites, d'abord utilisés pour cartographier le génome (Labbé *et al.* 2008). Et la comparaison de la séquence génomique avec des *Expressed Sequence Tags* (EST) préalablement disponible met en évidence l'existence de centaines de SNP (Tableau 1), exploitables pour estimer la diversité génétique de populations naturelles de *L. bicolor*, et potentiellement d'autres espèces du genre (Selosse et Martin 2008).

II.3. *Laccaria bicolor* et *L. amethystina*, espèces modèles de génétique des populations ectomycorhiziennes

Les premières études de la structure génétique des populations de *Laccaria* s'intéressaient à l'espèce *L. bicolor*, commune dans certains écosystèmes forestiers, décrivant ses génets pour essayer de comprendre la **dynamique** de ses populations locales : les changements, à des échelles temporelles variables, dans la composition de l'âge des populations, mais aussi les processus biologiques et environnementaux impliqués dans ces changements et leur importance écologique.

Baar *et al.* (1994) ont étudié la distribution spatiale et la taille de génets de *L. bicolor* dans une plantation néerlandaise de pins sylvestres, à l'aide de tests d'**incompatibilité somatique** (Encadré 2). Cette étude montrait que la taille des génets pouvait atteindre 12,5 m (Encadré 3), suggérant la coexistence de mycélium souterrain persistant (l'âge des génets était estimé entre 13 et 31 ans), et de petits génets, potentiellement nouvellement établis. de la Bastide *et al.* (1994) se sont également intéressés à la distribution et à la persistance de génets de *L. bicolor*, en suivant leurs fructifications de 2 à 4 ans dans une plantation d'épicéas. L'identification annuelle des génets, par type sexuel (Encadré 3) et RAPD, a démontré la capacité de persistance pendant au moins 3 ans de cette espèce ectomycorhizienne colonisatrice des premiers stades de la succession forestière.

Le suivi temporel des populations locales de *L. bicolor* a ensuite été appliqué au contexte de suivi de souches introduites par mycorhization contrôlée. Selosse *et al.* (1998, 1999) ont suivi l'évolution des populations de deux souches introduites dans une plantation française de *P. menziesii* en génotypant les fructifications à l'aide de l'IGS et de marqueurs RAPD. Ces études montrent la persistance des souches inoculées *L. bicolor* S238N et *L. bicolor* 81306 (une souche française) pendant au moins 10 ans après leur inoculation (Selosse *et al.* 1998, 1999). Dans cette étude, *L. bicolor* S238N fructifiait abondamment mais ne s'étendait pas aux arbres non inoculés et ne s'hybridait pas avec les souches indigènes de laccaires, malgré sa compatibilité avec certaines d'entre elles. Les arbres inoculés n'étaient pas colonisés par d'autres souches, et l'extension de S238N serait limitée par la compétition pour les niches à coloniser avec les souches indigènes. (Selosse *et al.* 1998). En revanche, de possibles introgressions nucléaires de la souche 81306 à des génets indigènes de *L. bicolor* apparaissaient (Selosse *et al.* 1999). Cette étude s'intéressait également aux génets indigènes de *L. bicolor*, et révélait des génets pouvant mesurer 3,3 m et persister au moins 3 ans (Selosse *et al.* 1999).

En 1998, Selosse et ses coauteurs considéraient que « *dans le futur, le genre Laccaria se développera probablement comme un modèle à la fois d'inoculation mycorhizienne et d'étude des populations fongiques perturbées* ». Les études de populations de *L. bicolor* se sont en effet inscrites dans la période des inoculations mycorhiziennes. Cependant, les populations naturelles de *L. amethystina* sont plus abondantes, multi-stades, et leur caractères morphologiques en font un modèle de biologie des populations facile à étudier. À partir de 1999, les populations de *L. amethystina* ont été privilégiées à celles de *L. bicolor* pour des suivis temporels. Ces études testent une proposition formulée en 1990 par Dahlberg et Stenlid, qui a été la base théorique de nombreuses études de populations locales d'espèces ectomycorhiziennes (Douhan *et al.* en préparation) : la présence de nombreux, petits génets suggérerait une colonisation récente par des basidiospores, alors que des génets plus grands indiqueraient une structure mycélienne plus étendue, croissant depuis un point d'établissement depuis plusieurs décennies et se trouvant souvent dans des milieux forestiers matures et fermés. Ces suivis peuvent également, comme les études de populations de

L. bicolor ou d'*Hebeloma cylindrosporum* (Guidot *et al.* 2002, 2004), révéler des mécanismes de compétition intraspécifique au niveau local.

Encadré 3 : taille des génets des champignons ectomycorhiziens

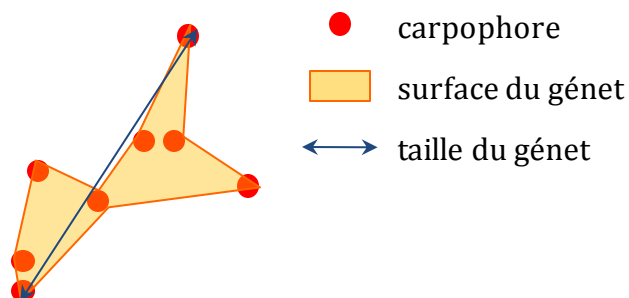
Les diverses études suivant les populations de champignons ectomycorhiziens par leurs fructifications (Figure 5) proposent différents estimateurs de la taille et la densité des génets, qui ne sont pas toujours harmonisés. Au cours de cette thèse, j'utiliserai les termes suivants :

Densité de génet : le nombre de génets identifiés sur un site par unité de surface ; pour pouvoir comparer ces valeurs, elle est extrapolée à partir de la surface du site en génets / ha, bien que de façon évidente cette densité ne soit pas homogène sur la surface d'un hectare de forêt

Génét : l'ensemble des carpophores relevés sur un site et partageant le même génotype

Surface d'un génet : la surface du polygone liant tous les carpophores externes d'un même génet

Taille de génet : la distance maximale entre deux carpophores appartenant au même génet



Taille maximale de génet : la taille du plus grand des génets d'un site

Taille moyenne de génet : la moyenne des tailles de génets d'un site, sans tenir compte des génets représentés par un carpophore unique (dont on peut difficilement estimer l'étendue du mycélium)

La première étude de dynamique des populations locales de *L. amethystina* a été publiée en 1999 par Gherbi et ses collaborateurs. L'étude a été menée sur une population de *L. amethystina* dans une hêtraie (*F. sylvatica*) alsacienne de 150 ans : les carpophores ont été collectés et cartographiés sur trois placettes de 100 m², de 1994 à 1997, et génotypés par polymorphisme de l'IGS et des RAMS (Random Amplified Microsatellites, équivalents à des RAPD avec des amorces microsatellites). Ces suivis ont révélé des fructifications abondantes, une forte **diversité génétique** locale (jusqu'à 5266 génets/ ha), et des **petits génets** (taille moyenne : 0,29 m), s'étendant au maximum sur une surface de 1 m², mais le plus souvent représentés par un carpophore unique. Cette petite taille des génets et la forte diversité génotypique spatiale suggèrent, selon les auteurs, des individus jeunes ayant récemment colonisé leur milieu et s'éteignant après 1 ou 2 ans de croissance végétative. Six génotypes échantillonnés en 1994 ont cependant fructifié au même endroit en 1997, montrant la persistance de certains mycéliums. Face à cette observation complémentaire, les auteurs proposaient une autre hypothèse : l'établissement initial des génets par des spores et leur persistance pluriannuelle, mais sans expansion, avec une fructification erratique, c'est-à-dire dans un état de **dormance** hypogée.

Fiore-Donno et Martin (2001) ont par la suite eux aussi identifié et spatialisé des génets de populations locales de *L. amethystina* d'une forêt suisse de 150 ans de conifères et feuillus, à l'aide du polymorphisme de l'ITS et de l'IGS1 et de marqueurs RAPD, sur 3 ans. Leur objectif était de préciser les rôles relatifs de l'expansion végétative et de l'établissement des spores dans la dynamique locale des populations de *L. amethystina*. Leur étude sur 209 carpophores montre une prépondérance de génets de petite taille : 75 % des 157 génets étaient représentés par un seul carpophore. Les génets mesuraient en moyenne 1,1 m ; leur taille maximale était de 5,4 m, le plus étendu regroupant 13 carpophores sur 0,75 m², et la densité des génets était élevée (jusqu'à 13800 génets/ha). Ces résultats concordaient avec ceux de Gherbi *et al.* (1999), et les auteurs résument les caractéristiques de cette population en génets nombreux, petits et peu persistants, reposant sur une **colonisation annuelle** par des spores. Ils soulignent la prédominance de la **reproduction sexuée** sur l'extension végétative chez *L. amethystina*.

Enfin, Wadud (2007) s'est intéressé à la dynamique des populations locales de *L. amethystina*, dans des conditions environnementales particulières. Ce champignon est, avec *L. laccata* et *Inocybe lacera*, une des espèces pionnières associées à *Salix reinii*, aux premiers stades de

recolonisation des pentes du Mont Fuji au Japon désertifiées par la dernière éruption du volcan en 1707. L'auteur note cependant la persistance des deux espèces de *Laccaria* dans les stades plus avancés de la succession. En trois ans, Wadud a collecté 224 carpophores sur un ensemble de 8 placettes de 4 m² chacune, et les a génotypés à l'aide de marqueurs microsatellites. Il a lui aussi observé une forte diversité génotypique et des génets de petite taille : les 224 fructifications formaient 44 génets en tout, dont 32% représentés par un seul carpophore, et mesurant 0,35 m en moyenne (1,20 m au maximum). La plupart des génets (27) n'étaient observés qu'une année, mais 7 ont persisté 2 années consécutives et 8 ont été échantillonnés pendant 3 années, proches de leur situation de l'année précédente. Face à la petite taille des génets et leur forte densité (jusqu'à 9700 génets/ha), l'auteur concluait à l'importance de l'établissement régulier des génets par des spores de reproduction sexuée, concordant avec les interprétations de Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001). Cependant, Wadud a comparé ses résultats obtenus à partir de relevés de carpophores à la structure génétique des **génets souterrains**, en prélevant des ectomycorhizes à l'automne et au printemps. À l'automne, les génets souterrains mesuraient en moyenne 0,25 m², contre 0,06 m² au printemps, et les génets persistants dans le sol après la saison de fructification étaient plus étendus, suggérant la nécessité d'une surface suffisante pour obtenir suffisamment de réserves pour fructifier et persister. Wadud estimait que 61% des génets identifiés par les carpophores étaient renouvelés d'une année à l'autre.

STRATÉGIES ÉCOLOGIQUES ET DYNAMIQUE LOCALE DES POPULATIONS DU BASIDIOMYCÈTE ECTOMYCORHIZIEN *LACCARIA AMETHYSTINA*

INTRODUCTION

Les résultats des études des populations locales de *L. amethystina* en forêts tempérées matures de Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001) concordent sur des génets petits (2 m entre 2 carpophores d'un même génet, 1 m² au maximum) et abondants (jusqu'à 13800 génets/ha), généralement observés une année seulement à travers leur fructification. Selon les concepts introduits par les travaux de Dahlberg et Stenlid (1990, 1994) et les interprétations des auteurs, ces résultats indiqueraient plutôt une stratégie rudérale, suggérant un renouvellement annuel des génets fructifiant puis n'apparaissant plus. Depuis la publication de ces études, *L. amethystina* a été régulièrement citée dans le cadre de publications portant aussi sur des dynamiques de populations locales de champignons ectomycorhiziens, comme exemple d'espèce ectomycorhizienne pionnière (Zhou *et al.* 2001 ; Redecker *et al.* 2001 ; Bergemann et Miller 2002 ; Liang *et al.* 2004 ; Dunham *et al.* 2006 ; Carriconde *et al.* 2006 ; Carriconde *et al.* 2008 par exemple). Cette identification de *L. amethystina* à une espèce de stratégie rudérale est corroborée par les travaux de thèse d'Abdul Wadud (2007), mais dans un contexte écologique très particulier : les premiers stades de recolonisation (une succession primaire) d'un désert volcanique.

Il est toutefois étonnant d'observer cette hypothétique stratégie rudérale en forêts matures, non perturbées récemment –les sites étudiés par Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001) sont des forêts de 150 ans. Et dans un sens, cette hypothèse va à l'encontre des travaux de Dahlberg et Stenlid (1990), selon qui cette stratégie se trouverait en forêts jeunes, en reconquête après leur perturbation. En observant la fructification récurrente de quelques génets 3 années après leur première identification, au même endroit, Gherbi *et al.* (1999) ont proposé une hypothèse alternative de persistance des génets sans expansion, et l'idée que la prédominance de la reproduction sexuée sur la croissance végétative du mycélium dans le sol pourrait, en réalité, ne pas être propre aux espèces pionnières. Fiore-Donno et Martin (2001) privilégiaient clairement l'hypothèse d'une stratégie rudérale, en notant cependant que 4% des

génets identifiés dans leur étude fructifiaient à nouveau dans les 2 années suivant leur premier échantillonnage.

D'autre part, la description de la structure génétique et des variations spatio-temporelles des populations dépend à la fois de la qualité de l'échantillonnage – il doit être aussi exhaustif que possible pour un suivi de dynamique des populations – et de la puissance et de la répétabilité des marqueurs génétiques utilisés pour l'identification des génets. Les marqueurs RAPD et RAMS, par exemple, sont dominants, basés sur l'amplification de fragments non choisis, et souffrent parfois de défaut de reproductibilité (Tableau 1) ; leur facilité de contamination peut conduire à la surestimation de la diversité génétique d'une population, et ainsi de la taille des génets. La persistance observée d'une plus grande part des génets de *L. amethystina* identifiés par Wadud pourrait s'expliquer par la meilleure qualité de ses marqueurs microsatellites, neutres, codominants, et reproductibles.

La question de la stratégie écologique de *L. amethystina* en forêt tempérée européenne n'est donc pas résolue. **Deux hypothèses** se présentent : (i) une stratégie rudérale, où la reproduction sexuée est prépondérante sur la croissance végétative (stratégie normalement rencontrée en milieux perturbés), et où les génets disparaissent et sont renouvelés annuellement par des spores méiotiques (Figure 3) ; et (ii) une stratégie « cryptique » de persistance dans le milieu, avec peu d'investissement dans la croissance et dans la reproduction sexuée, fructifiant rarement mais persistant sous forme d'appareil végétatif souterrain (Fiore-Donno et Martin 2001).

La première hypothèse est actuellement privilégiée, suite aux interprétations de la description des génets sur la base des carpophores. Mais ces résultats peuvent cacher une persistance peu visible de génets fructifiant sporadiquement, au-delà du cadre temporel des études, et pouvant sembler disparus quand leurs fructifications ne sont plus observées. Un moyen d'explorer l'hypothèse de persistance cachée serait d'observer directement la dynamique des mycéliums souterrains, et d'accéder ainsi à l'information génétique totale des génets présents dans le milieu. Mais cette démarche est destructive, et permet difficilement un suivi pluriannuel des populations de mycélium. D'autre part, le mycélium de *L. amethystina* semble peu abondant dans le sol (F. Richard et M-A. Selosse, observations personnelles). Une autre solution

d'estimer la diversité génétique des populations en relevant les fructifications, mais en prolongeant ces suivis à plus long terme, de 5 à 10 ans, pour observer plus probablement les génets fructifiant sporadiquement. Nous avons donc choisi de mettre en place, au cours de ma thèse, une démarche de suivi des populations locales de *L. amethystina*, à l'aide (i) de **placettes permanentes** de relevé des fructifications locales et (ii) de **marqueurs génétiques fiables**, et qui pourra être poursuivie plusieurs années afin d'étudier plus précisément la participation de génets pluriannuels à la dynamique des populations de ce champignon ectomycorhizien.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites d'échantillonnage

En octobre 2007, j'ai établi deux placettes de suivi à long terme des fructifications de *L. amethystina* dans le Bois de Miquel, au Col de Faubel (Cévennes, département du Gard ; altitude : 1337 m ; Figure 8). L'objectif d'échantillonnage est de cartographier exhaustivement les carpophores et d'en prélever des tissus pour les génotyper, pendant plusieurs années, sur des sites repérés de façon permanente. Le Bois de Miquel est une hêtraie-paissière (*P. abies* / *F. sylvatica*) en phase de maturité. Chaque placette s'étend sur 3x10m, et les sommets de ces placettes rectangulaires sont repérés en coordonnées GPS (Placette 1 : 44°05'408" N, 3°31'255" E ; Placette 2 : 44°05'402" N, 3°31'304" E). Les placettes sont espacées entre elles de 80 m (Figure 8).

D'octobre à novembre, en 2007 et 2008, j'ai suivi tous les 10 jours l'émergence de carpophores sur les placettes, cartographié les carpophores avec une précision d'environ 1 cm, et prélevé un morceau de chapeau (plutôt que de prélever tout le carpophore, afin de permettre sa sporulation) pour en extraire l'ADN. J'ai également relevé la persistance des carpophores présents lors du relevé précédent.

Au cours de la saison de fructification, j'ai relevé 42 et 176 carpophores respectivement sur les placettes 1 et 2 en 2007, et 24 et 21 carpophores l'année suivante. Chaque relevé sur une placette pour une année est considéré comme une « population » lors de l'analyse des données. Par exemple, la population « 1-2007 » est l'ensemble des carpophores relevés sur la placette 1 en 2007.

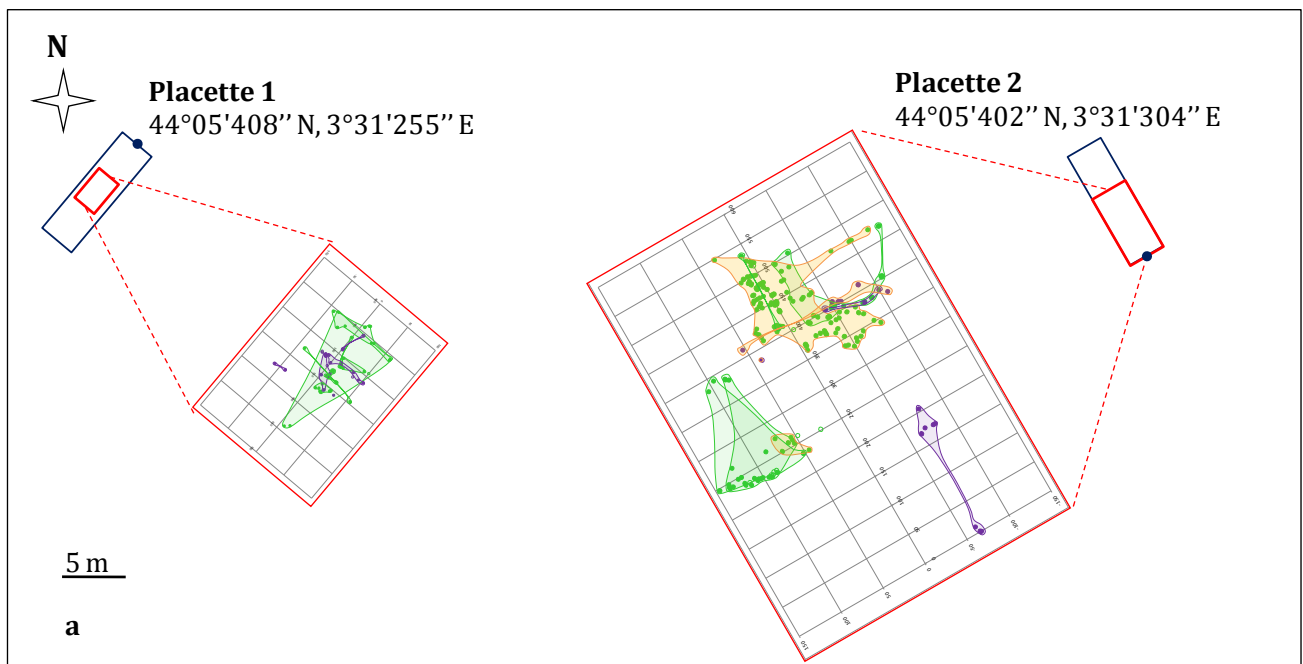


Figure 8 : Placettes de suivis de fructification dans le Bois de Miquel. **a**, orientation des deux placettes sur le site ; chaque rectangle bleu matérialise une placette ; les zones grossies sont celles où se trouvent tous les carpophores. **b**, vue de la placette 2 ; les deux décimètres extérieurs sont espacés de 3 m.

Génotypages

L'ADN des carpophores a été extrait selon le protocole de Roy *et al.* (2008), et les individus ont été génotypés à l'aide des 8 marqueurs microsatellites *Jl1195M13*, *Ll35*, *La171*, *Jl1209M5*, *La03*, *La17*, *La 23* et *Lv257* et du locus variable de l'IGS1 (Encadré 2), selon les protocoles présentés dans Vincenot *et al.* (en préparation).

Analyse des données

Les analyses statistiques des populations ont été réalisées sur 2 jeux de données : l'un regroupant les génotypes de tous les carpophores (« **jeu complet** »), le second ne prenant chaque génotype en compte qu'une seule fois (« **jeu corrigé** »). Ce second jeu de données permet de ne pas donner plus de poids dans l'analyse aux génotypes partagés par plusieurs carpophores qu'à ceux portés par un seul. Les fréquences alléliques, les hétérozygoties attendues (H_e) et observées (H_o), l'écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg, le déséquilibre de liaison entre paires de loci et les indices de Wright (F_{IS} , F_{ST}) ont été calculés à l'aide du logiciel GENEPOP'007 (Rousset 2008). Pour tester la résolution du jeu de marqueurs génétiques, la probabilité d'occurrence par hasard de chaque génotype a été calculée à partir des fréquences alléliques, prenant en compte tous les carpophores (Bergemann et Miller 2002). Les taux d'autofécondation s ont été estimés par le logiciel RMES, à partir des déséquilibres entre loci, et insensible aux biais techniques des marqueurs moléculaires (allèles nuls ou partiellement dominants) créant des déficits en hétérozygotes virtuels (David *et al.* 2007). La part de variance liée à la différenciation entre les populations d'une année ou d'une placette a été estimée par une AMOVA, avec le logiciel Arlequin v 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Les tests d'autocorrélation spatiale ont été réalisés avec le logiciel SPAGeDI (Hardy et Vekemans 2002), en utilisant le « jeu corrigé » de données, les génets étant centrés sur le barycentre de la surface formée par leurs carpophores. Ils estiment la corrélation entre le coefficient d'apparentement (Loiselle *et al.* 1995) entre individus et leur distance spatiale, et permettent si l'autocorrélation est significative de calculer la taille du voisinage génétique de la population observée (Encadré 1).

Tous les carpophores portant un même génotype sur une même parcelle sont considérés comme les fructifications d'un même génet. La taille des génets a été mesurée par la distance entre les 2 carpophores les plus éloignés d'un même génet. La surface des génets calculée est la surface du polygone liant tous les carpophores externes d'un même génet (Encadré 3).

RÉSULTATS

Diversité allélique populationnelle

Les richesses alléliques au sein des populations (Tableau 2) ne présentent pas de variation significative entre populations, entre années ou entre parcelles pour les deux années. Il y a peu d'allèles privés (c'est-à-dire propres à une population) : chacune en compte 1 ou 2, sur 17 à 19 allèles au total. La plupart appartiennent à un seul génotype, mais l'allèle « 112 » du locus *Jl1209M5*, propre à la population 1 de 2008, est porté par 9 génotypes sur 11.

La probabilité maximale d'occurrence d'un génotype par hasard était de 0,016 en considérant le jeu complet de données, et de 0,004 en ne prenant en compte qu'un exemplaire de chaque génotype dans chaque population. Cette probabilité signifie que sur les 45 génotypes identifiés, 0,18 pourrait l'être par le hasard des fréquences alléliques au sein des populations. Ce risque de mésidentification d'un génet étant très faible, nous avons considéré que cette résolution était suffisante pour l'étude.

Structure génétique intra-populations

L'analyse des fréquences alléliques montre un écart significatif à l'équilibre de Hardy-Weinberg (excès d'hétérozygotes) pour chacune des populations (avec le jeu complet de données), et pour les populations 2-2007 et 1-2008 seulement avec le « jeu corrigé » de données.

Pour chacune des populations, le F_{IS} est négatif, reflétant un excès en hétérozygotes, quel que soit le jeu de données utilisé (Tableau 3). Si chaque génotype n'est considéré qu'une fois par population, seules les populations de 2007 présentent une paire de loci en déséquilibre de liaison (*La171-IGS1* pour 1-2007 et *Jl1195M13-La17* pour 2-2007 ; Tableau 3). Enfin, l'estimation du taux d'autofécondation s indépendamment des valeurs de F_{IS} par la méthode de David *et al.* (2007) indique des taux d'autofécondation intra-population faibles (Tableau 3 ; et 8 à 12 fois plus faibles sur la placette 2 que sur la placette 1).

Tableau 2 : Richesses alléliques au sein des populations locales de *L. amethystina*. **a**, N : nombre de carpophores analysés par population. **b**, entre parenthèses, nombre d'allèles privés dans chaque population. **c**, Pl1, Pl2 : placette 1, placette 2

Population	N ^a	Igs1	Jl1195M13	Jl1209M5	La03	La17	La23	La171	Ll35	Lv257	Total
1-2007	42	2	1	1	2	4 (1)	2	3	1	2	18 (1)
1-2008	24	2	1	2 (1) ^b	2	3	2	3	2	2	19 (1)
2-2007	176	2	2	3 (1)	1	2	3 (1)	1	2	2	18 (2)
2-2008	21	2	2	1	1	2	2	2	3 (1)	2	17 (1)
total 2007	218	2	2	3 (1)	2	4 (1)	3 (1)	3	2	2	27 (3)
total 2008	45	2	2	2	2	3	2	4 (1)	3 (1)	2	22 (2)
total Pl1 ^c	66	2	1	2	2	4 (1)	2	3	2	2	20 (1)
total Pl2	197	2	2	2 (1)	1	2	3(1)	2(1)	3 (1)	2	19 (4)

Tableau 3 : Estimateurs du régime de reproduction des populations locales de *L. amethystina*. **a**, après correction de Bonferroni. **b**, tous échantillons : analyse du jeu complet de données. **c**, tous génotypes : analyse du jeu de données « corrigé ».

Population	Hétérozygoties				Nombre de paires de loci en déséquilibre de liaison ^a			
	$H_e; H_o$	$H_e; H_o$	F_{IS}	Taux d'autofécondation s	$H_e; H_o$	F_{IS}	Taux d'autofécondation s	
	Tous échantillons	Tous génotypes ^c	Tous échantillons	Tous génotypes	Tous échantillons	Tous génotypes	Tous échantillons	Tous génotypes
1-2007	17 ; 21	7 ; 9	-0,25	-0,05	0,01	0,12	5	1
1-2008	10 ; 13	5 ; 6	-0,32	-0,30	0,07	0,08	7	0
2-2007	66 ; 100	6 ; 9	-0,52	-0,29	0,27	0,01	6	1
2-2008	8 ; 11	2 ; 3	-0,51	-0,35	0,01	0,01	3	0

Dynamique des populations

La période de fructification s'est étendue du 19 octobre au 13 novembre en 2007 (le 13 novembre, le sol était gelé), et du 29 octobre au 15 novembre en 2008 (le 24 novembre, le site était enneigé).

Sur les placettes 1 et 2, les carpophores ont persisté jusqu'à 25 jours (un carpophore présent à un relevé étant présent au relevé suivant ; Tableau 4). La plupart des génets étaient représentés par un seul carpophore, mais la taille du plus grand atteignait 1,91 m sur la placette 1 (Figure 9a), et 2,35 m sur la placette 2 (Figure 9b). Les densités de fructifications extrapolées s'élevaient de 2000 génets/ha à 5300 génets/ha (Tableau 4).

Aucun génotype n'a été échantillonné à la fois en 2007 et en 2008 sur la placette 1, mais deux génets ont été prélevés deux années consécutives sur la placette 2. L'un, de 0,05 m² en 2007 (7 carpophores), a été échantillonné 1,15 m plus loin l'année suivante, avec un seul carpophore. Le second était le plus étendu de 2007 (il mesurait 1,57 m² et comptait 106 carpophores), en 2008 il regroupait 7 carpophores sur une surface de 0,08 m² (Figure 9b). Les probabilités d'occurrence de ces génotypes par hasard sont comparables à la probabilité moyenne des génotypes (0,003 et 0,004, contre 0,004 en moyenne dans toutes les populations). La persistance saisonnière des génets n'est corrélée à leur taille sur aucune des parcelles.

Tableau 4 : Diversité locale et description des génets de *L. amethystina* en 2007 et 2008

	<i>Placette 1</i>		<i>Placette 2</i>	
	<i>2007</i>	<i>2008</i>	<i>2007</i>	<i>2008</i>
Persistance annuelle des carpophores (en jours, au minimum)	25	17	25	8
Nombre de carpophores	42	24	176	21
Nombre de génets	16	11	15	6
Diversité génotypique (génets/carpophores)	0,38	0,46	0,08	0,29
Génets à un seul carpophore	8	6	9	4
Taille moyenne des génets à plus d'un carpophore (m)	65,4	33,7	1,39	1,43
Taille maximale des génets (m)	1,91	0,60	2,35	2,04
Surface du plus grand génet (m ²)	1,35	0,08	1,57	0,24
Nombre de carpophores du plus grand génet	4	6	106	8
Densité de génets (génets/ha)	5333	3667	5000	2000

Les tests d'autocorrélation spatiale, comparant au sein de chaque population le coefficient d'apparementement entre les génets et leur distance spatiale ont montré, sur la placette 1, une très faible autocorrélation en 2007 ($r^2=0,20$; $p=0,10$), et une faible autocorrélation spatiale en 2008 ($r^2=0,32$; $p=0,03$). Sur la seconde placette, une forte autocorrélation spatiale existe en 2007 ($r^2=0,94$; $p=0,0001$), faible en 2008 ($r^2=0,07$; $p=0,03$). L'apparementement au sein des populations de 2007 et 2008 est corrélé à la distance pour les 2 placettes (placette 1 :

$r^2=0,75$ et $p=0,006$; placette 2 : $r^2=0,02$ et $p=0,24$). La faiblesse des corrélations interannuelles et pour l'année 2008 ne permettait pas d'estimer la dispersion des individus à l'aide du logiciel SPAGeDI. Pour la placette 2 en 2007, la taille du voisinage génétique est estimée à 3,28 cm.

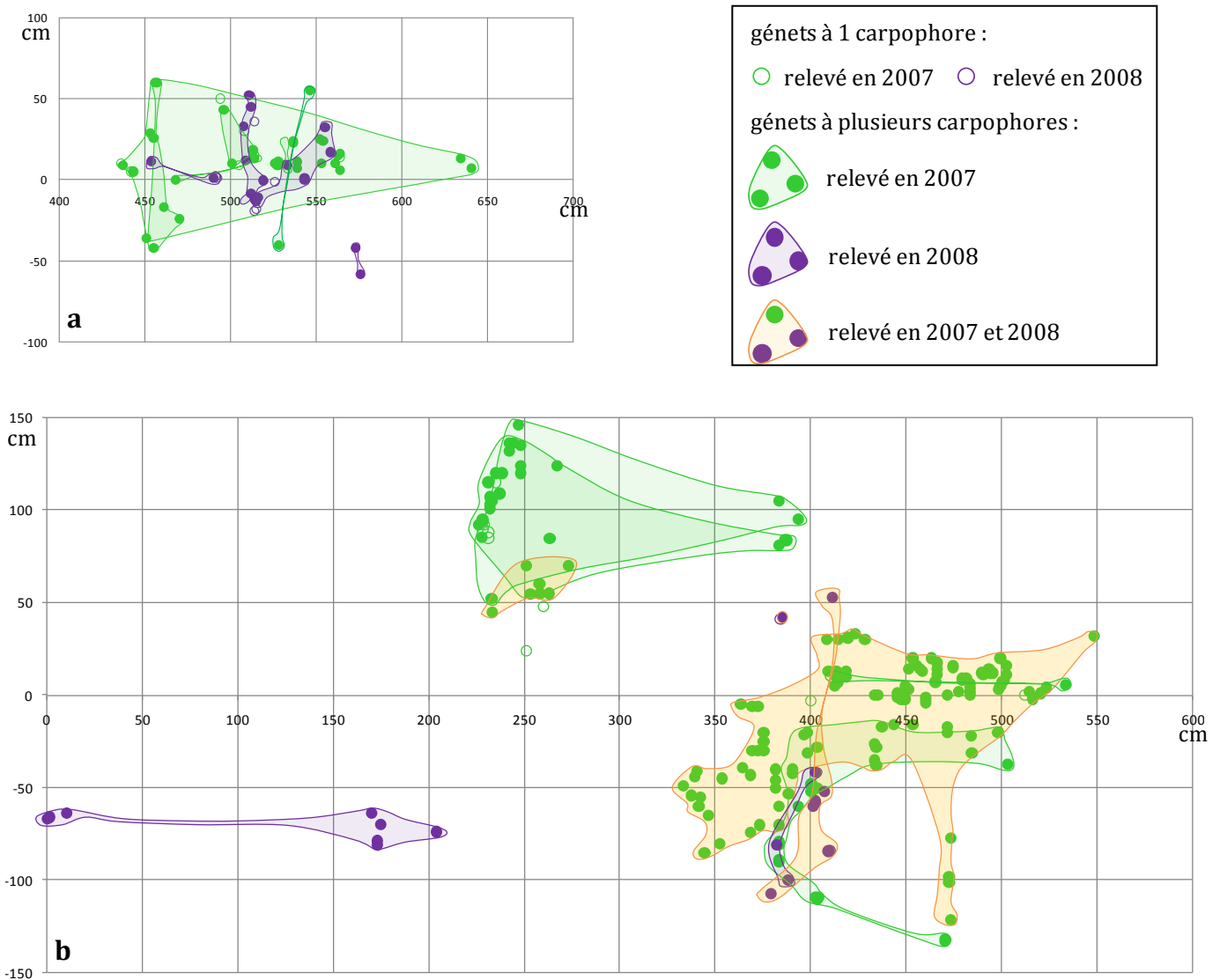


Figure 9 : Cartographie des génets en 2007 et 2008 sur les placettes 1 (**a**) et 2 (**b**). Les zones représentées sont celles agrandies sur la Figure 8. Elles regroupent tous les carpophores prélevés sur les placettes.

La cartographie des génets (Figure 9) révèle leurs tailles et leur forme, et quelques caractères spatiaux. Sur les 2 placettes, il existe des zones de mélange, où les mycéliums (supposés par la position de leurs carpophores) de plusieurs génets se chevauchent, parfois de part en part. Il apparaît également que, pour les génets à plusieurs carpophores, ces carpophores sont souvent regroupés en bouquets. Enfin, la position des fructifications de génets allongés, notamment sur la placette 2, semble liée à la présence de débris de bois, pouvant créer localement des conditions environnementales favorables à la fructification (Figure 8b). Cette hypothèse sera explorée par une cartographie précise de ces objets au sol lors des relevés suivants.

Structure génétique inter-populations et interannuelle

Un seul génotype était partagé en 2007 entre les placettes 1 (7 carpophores regroupés sur 0,014 m²) et 2 (1 seul carpophore), séparées de 80 m. La probabilité d'occurrence de ce génotype par hasard était de 0,002. Aucun génet commun n'était présent sur les 2 placettes l'année suivante.

Les indices de différenciation génétique (F_{ST}) entre populations prélevées une même année sont élevés et très significatifs (F_{ST} de 0,13 à 0,24) quel que soit le jeu de données considéré. Les différenciations génétiques entre années, pour des populations prélevées sur une même placette, sont plus modérées selon que tous les échantillons ou seuls les génotypes sont considérés dans les analyses ($F_{ST} = 0,09$ et 0,106 pour la placette 1 ; $F_{ST} = 0,043$ et 0,048 pour la placette 2 ; Tableau 5).

Tableau 5 : Indices de différenciation génétique (F_{ST}) entre paires de populations. Diagonale supérieure : valeurs obtenues pour le jeu corrigé de données ; diagonale inférieure : valeurs obtenues pour le jeu complet de données

F_{ST} entre populations	1-2007	2-2007	3-2008	4-2008
1-2007	-	0,242	0,090	0,116
2-2007	0,133	-	0,254	0,048
3-2008	0,106	0,213	-	0,179
4-2008	0,102	0,043	0,1784	-

Des AMOVA concordent avec les indices de différenciation : les variations interannuelles de la structure des populations n'expliquent rien de la variabilité génétique totale, tandis que les variations intersites en expliquent 8,9% et 16,2% (respectivement, sur un jeu de données complet ou corrigé ; $p=0,000$). Les variations intra-population expliquent de 78 à 88% de la variabilité génétique, selon le jeu de données analysé. Les tests d'autocorrélation spatiale d'une année à l'autre sont significatifs pour la placette 1 : l'apparement des carpophores de 2007 et 2008 est corrélé à leur distance spatiale ($r^2=0,56$; $p=0,006$). Ces résultats suggèrent que le facteur spatial crée plus de variabilité génétique que le facteur temporel (sur 2 ans) pour ces populations locales de *L. amethystina*.

DISCUSSION

Régime de reproduction (voir aussi Chapitre IV.3)

Chacune des populations locales de *L. amethystina* s'écarterait statistiquement de l'équilibre des fréquences alléliques de Hardy-Weinberg, et les excès en hétérozygotes observés concordent avec les résultats de Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001), comme les fortes diversités génotypiques ($\geq 0,38$ pour 3 populations). Le faible déséquilibre de liaison entre les génotypes témoigne de l'existence de recombinaison génétique. Ces résultats montrent l'importance de la reproduction sexuée dans la structure des populations locales de *L. amethystina*. Et l'abondance des carpophores produits, même par de petits génets, semble aller dans le sens d'un investissement fort des génets dans leur structure de **reproduction sexuée**.

Comme dans les études de Gherbi *et al.* (1999), Fiore-Donno et Martin (2001) et Wadud (2007), les génets observés ici sont petits (0,50 et 1,41 m en moyenne) ; 54 % apparaissent même très petits, comptant un seul carpophore. Cependant, certains génets peuvent atteindre une taille de 2,35 m (cette taille ne semble pas résulter d'une mauvaise identification des génets par nos marqueurs ; 5,4 m dans l'étude de Fiore-Donno et Martin 2001). Cette taille témoigne de l'existence d'individus de *L. amethystina* suivant majoritairement une **croissance végétative**.

Cet ensemble de résultats suggère des populations où expansion végétative et reproduction sexuée ont toutes les deux de l'importance chez les individus de *Laccaria amethystina*.

Capacité de dispersion de *L. amethystina*

Les abondantes fructifications des génets de *L. amethystina* permettent la dispersion des basidiospores haploïdes, et l'existence de reproduction sexuée mêlant le patrimoine génétique de plusieurs individus. La petite taille des génets peut laisser supposer qu'ils sont jeunes, établis récemment par la germination de spores. Elle peut aussi refléter des génets vieux, à croissance lente. Dans le cas de la première hypothèse, quelle serait l'origine des spores qui établiraient régulièrement de nouveaux génets ? Seraient-elles issues des carpophores des générations précédentes, ou sont-elles le fruit de la migration ? Les tests d'autocorrélation spatiale pour une année sont significatifs pour 3 placettes : les génets apparentés seraient aussi plus proches spatialement. L'estimation de la taille du voisinage génétique suggère une dispersion des spores dans un périmètre limité à la taille du carpophore, correspondant à une **pluie de spores** locale (Kay et Vilgalys 1992 ; Lee *et al.* 2006). Les spores établissant les nouveaux génets seraient alors issues des carpophores présents auparavant sur la même placette, comme le suggère la corrélation positive existant entre l'**apparentement** des carpophores de deux années consécutives et leur proximité spatiale (cet apparentement pourrait cependant indiquer la fructification de génets proches génétiquement, mais pas nouvellement établis). La différenciation génétique significative entre 2 populations distantes de 80 m ($F_{ST} > 0,13$) et la part de variabilité expliquée par le facteur spatial suggèrent également une dispersion des spores très limitée à l'échelle locale. Dans les populations de *L. amethystina* du Mont Fuji, Wadud (2007) a observé que les génets apparentés étaient distants de moins de 20 cm, suggérant là aussi l'existence d'une forte structure génétique spatiale.

Wadud (2007) a également observé l'agrégation des allèles rares sur de petites surfaces. Selon lui, cette observation suggèrerait une dispersion de la majorité des spores à faible distance. Les premiers résultats de notre étude montrent, de façon comparable, que la plupart des allèles privés sont rares et existent chez un seul génotype. Une explication alternative serait l'apparition ponctuelle, une année, d'un allèle privé et qui n'apparaîtrait plus l'année suivante (cette hypothèse pourra être testée par un suivi pluriannuel des génets). Cette disparition des allèles rares suggèrerait plutôt que la descendance des carpophores ne s'établit pas à sa proximité, mais que les spores sont dispersées au-delà. Les taux d'autofécondation estimés ne quantifient pas l'autofécondation entre haplontes d'un même individu de *L. amethystina*, limitée par l'incompatibilité sexuelle. Ils reflètent la fécondation entre spores issues d'un même

individu, ou la transmission d'un noyau d'un individu à sa descendance par phénomène de Büller (fusion d'un mycélium parent avec sa descendance, peut-être observé aux marges des génets d'*H. cylindrosporum* ou de *T. matsutake*). La faiblesse de ces taux d'autofécondation ($\leq 0,12$) montre que la fécondation entre elles de spores d'un même carpophore parent est spatialement limitée, suggérant la **dispersion des spores** au-delà de la surface couverte par le génet parent.

Fiore-Donno et Martin (2001) n'observaient pas de corrélation entre distance spatiale et similarité génétique, suggérant la dispersion des spores au-delà de leur surface d'échantillonnage (5x10 m). Le désaccord entre ce résultat et les corrélations significatives observées pour notre étude pourrait éventuellement s'expliquer par (i) des marqueurs moléculaires différents (RAPD ou microsatellites), ou (ii) une technique d'échantillonnage différente (échantillonnage des carpophores entiers ou d'une partie seulement, permettant la sporulation). La recherche d'autocorrélation spatiale sur un plus grand nombre d'années pourrait apporter un résultat plus robuste, et confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une structure génétique spatiale des populations de *Laccaria amethystina* à très petite échelle. Amend *et al.* (2009a) ont détecté une autocorrélation spatiale entre 0 et 42 m dans des populations de *T. matsutake* en forêts jeunes. Carriconde *et al.* (2008) ont également révélé une structure génétique spatiale jusqu'à 20 m dans des populations de *T. scalpturatum*, et Kretzer *et al.* (2005) chez *R. vesiculosus* jusqu'à 26 m. Ces distances d'interception de l'axe des abscisses sont beaucoup plus élevées que celles détectées chez *L. amethystina* (0,55 m et 1, 50 m pour les placettes 1 et 2 respectivement). Cette différence d'échelle peut venir de la surface d'échantillonnage : les populations de *L. amethystina* fructifient, abondamment, sur des zones réduites et ne permettent pas d'échantillonnage homogène sur des dizaines de mètres comme pour les études ci-dessus.

Nos premiers résultats ne permettent pas de répondre à la question de l'origine des spores qui établiraient de nouveaux génets, et l'estimation de la distance de dispersion des spores reste difficile avec seulement 2 ans de suivi des populations locales, sur de petites surfaces. Il est vraisemblable que la majorité des spores tombent à proximité directe des carpophores, en

pluie de spores. Une partie, inestimée, des spores serait cependant dispersée (à des distances inestimées également), soit par des organismes mycophages soit par anémochorie. Wadud (2007) considère que la dispersion des spores est une contrainte pour l'établissement d'un génét, car il faut que la germination ait lieu dans un environnement favorable. La dispersion limitée serait alors un avantage pour le génét fructifiant, facilitant l'établissement de sa descendance. Cependant, les conditions micro-environnementales peuvent varier intensément, et ne plus satisfaire au développement d'un génét. D'autre part, la germination des spores à proximité du carpophore parent peut créer une situation de compétition entre individus apparentés (voire avec le parent, s'il a persisté). La dispersion des basidiospores d'un génét serait alors une forme de « *bet-hedging* » (Yoshimura et Clarck 1991, *e.g.*): plutôt que d'être toutes exposées aux mêmes conditions environnementales que leur parent, une partie des spores pourraient atteindre des environnements variables, potentiellement des habitats favorables, et éviter la compétition avec leurs apparentés.

Il apparaît que la dispersion des spores des champignons basidiomycètes ectomycorhiziens est très mal connue, et difficile à résoudre par l'observation des carpophores : ces fructifications ne reflètent pas directement l'établissement d'une spore ni sa localisation, mais la présence d'un mycélium dicaryotique issu de la fusion des mycéliums de deux spores. La persistance temporelle des spores avant leur germination est inconnue en milieu naturel, et d'autre part, la fructification des génets a lieu après une phase de croissance végétative du mycélium dicaryotique, dont la durée et l'expansion spatiale peuvent également varier de manière inestimée. Les suivis de carpophores peuvent apporter des éléments de réflexion sur la dynamique locale des populations des Basidiomycètes ectomycorhiziens, et les tests d'apparentement semblent en effet pouvoir décrire finement la structure génétique spatiale des populations à une échelle locale, et ainsi d'accéder aux processus qui modèlent les populations, comme la dispersion et l'établissement des individus, et à leur biologie reproductive (Carriconde *et al.* 2008). Des tests d'apparentement et d'autocorrélation spatiale, répétés sur plusieurs années, pourraient estimer les capacités de dispersion locale de *L. amethystina* (mais il est à noter que le prélèvement, même d'un morceau de chapeau, peut perturber la sporulation du carpophore ; idéalement, il faudrait le prélever après la maturité du carpophore). Une autre solution, plus empirique que l'interprétation des données

moléculaires, pour comprendre les processus de dispersion des spores au niveau local serait d'utiliser des pièges à spores (James et Vilgalys 2001 ; Millington et Corden 2005) afin de caractériser la distribution des distances de dispersion.

Dynamique locale et stratégie écologique des populations de *L. amethystina*

Dans les populations locales de *L. amethystina* au Col de Faubel, seuls 2 génets (sur 46) ont fructifié en 2007 et 2008 . Selon les interprétations des études précédentes en forêts matures, où la plupart des génets ne fructifiaient qu'une année (sur 3 ans de suivi), ce résultat concorderait avec la petite taille des génets, et suggérerait une faible persistance des génets d'une année à l'autre en forêt mature.

Hypothèse 1 : une stratégie pionnière en forêt mature

Les premiers résultats des suivis de populations locales de *L. amethystina* au Col de Faubel concordent avec les études des Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001) dans d'autres forêts matures : les génets apparaissent petits, génétiquement divers, abondants, et jeunes. Ces caractères correspondent à une stratégie pionnière, ou rudérale, d'établissement régulier de nouveaux individus dans un écosystème, généralement perturbé (Grime 2002 ; Figure 10). Ces traits d'histoire de vie correspondent aussi à la description d'une espèce ectomycorhizienne pionnière selon les travaux de Dahlberg et Stenlid (1990 ; Figure 10), à l'exception du milieu : cette stratégie écologique correspondrait, habituellement, à des espèces colonisant les premiers stades de succession d'un milieu, comme *L. amethystina* et *L. laccata* sur les pentes du Mont Fuji (Wadud 2007), *Cantharellus formosus* (Dunham *et al.* 2003) ou *Tricholoma scalpturatum* (Carriconde *et al.* 2008 ; Tableau 6). Une **stratégie pionnière en forêt mature** suggère une disparition rapide des parties souterraines des génets, c'est-à-dire des mycorhizes établies, et une recolonisation constante des racines fines par de nouveaux génets. Une telle recolonisation régulière impliquerait l'établissement répété de nouveaux génets, par l'arrivée de nouvelles spores. Il existe d'autres exemples d'espèces ectomycorhiziennes de stratégie rudérale et présentes en forêt mature, comme *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* ou *Amanita franchetii* (Redecker *et al.* 2001), et chez

plusieurs espèces il est possible d'observer une combinaison des caractères des stratégies R,C et S, (*Pisolithus* cf. *alba*, Anderson *et al.* 1998, 2001 ; *Suillus pungens*, Bonello *et al.* 1998 ; Tableau 6).

Hypothèse 2 : une stratégie de persistance végétative tolérante au stress

Cependant, chacune des études portant sur la dynamique des populations locales de *L. amethystina* montre la persistance d'une part des génets sur la base de leurs fructifications, pendant 2 à 3 ans. Cette proportion de génets persistants est variable, selon le site et ses conditions, et vraisemblablement également selon les marqueurs génétiques utilisés. Dès le premier suivi des populations locales de *L. amethystina*, Gherbi *et al.* (1999) ont émis l'hypothèse de la persistance pluriannuelle de certains génets dans le sol, fructifiant sporadiquement quand les conditions environnementales sont favorables. Par ailleurs, les génets persistants dans le sol semblent ne pas s'étendre rapidement d'une année à l'autre : selon les études de Gherbi *et al.* (1999) et Fiore-Donno et Martin (2001), les génets persistants sont ré-échantillonnés aux mêmes positions que précédemment. Au Col de Faubel, des deux génets persistants, l'un a fructifié à des positions très proches (moins de 50 cm) et ses zones de fructifications pour les 2 années se recouvrent partiellement ; l'autre a formé en 2008 un unique carpophore, à 1 m de sa position en 2007. Plutôt qu'une extension de mycélium (1 m/an dépasse les vitesses de croissance généralement estimées), il peut s'agir d'un phénomène de « *homing* » (Fries 1983) : un génet, persistant plusieurs années, fructifierait en différents points sans que la position de son mycélium végétatif ait changé (ou alors très faiblement). Une persistance souterraine, sans fructification ni forte croissance végétative, est une hypothèse plausible pour une espèce ectomycorhizienne en forêt mature : contrairement à un saprophyte, sa ressource nutritive ne s'épuise pas, et la structure mycorhizienne peut donc persister sans que le champignon ne doive s'étendre ou fructifier. C'est par exemple ce qu'ont montré Zhou *et al.* (2001) pour *Suillus grevillei*, qui persiste en fructifiant rarement (Tableau 6). Selosse *et al.* (1999 et Selosse 1998) observaient une dynamique semblable pour des génets indigènes de *L. bicolor* : certains génets fructifient pendant 4 années successives, sans s'étendre spatialement, tandis que d'autres n'étaient identifiés qu'une année (Tableau 6). Ils notaient aussi que l'absence de carpophores n'est pas informative : certains génets de *L.*

bicolor avaient fructifié en 1994 et 1997, laissant supposer leur persistance sous forme de mycélium végétatif. Cette stratégie de **persistance végétative**, avec une croissance lente et peu d'investissement dans la reproduction sexuée, a été décrite par Grime (2002) comme « **tolérante au stress** » (Figure 10), et se retrouve chez d'autres modèles fongiques ectomycorhiziens que *L. amethystina* (Tableau 6).

La persistance du mycélium souterrain, sans fructification ni expansion, pourrait être une forme de dormance, où l'individu présenterait peu d'activité physiologique entre deux périodes de fructifications. Cependant, pour différentes espèces longévives, un organisme peut persister de longues années sans reproduction sexuée ni croissance végétative si les conditions environnementales sont favorables (Grime 2002). Gardes et Bruns (1996) ont par exemple comparé les diversités épigées (fructifications) et souterraines (mycorhizes) des communautés ectomycorhiziennes sous *Pinus muricata* pendant 4 ans. Leur étude montre une discordance entre ces deux images des communautés pour certaines espèces. Certaines fructifient abondamment mais sont peu représentées par leurs mycorhizes (*Suillus pungens*) ; à l'inverse, d'autres espèces, communes dans le sol, ne fructifiaient que peu ou pas du tout (*e.g.* *Russula amoenolens*, *Tomentella subulilacina*). Cependant, abondances épigées et souterraines peuvent concorder pour certaines espèces, comme *Amanita franchetii* ou *Russula xerampelina* (Gardes et Bruns 1996), et la position des carpophores peut refléter celle du mycélium associé, comme chez *H. cylindrosporum* (Guidot *et al.* 2001, 2003) ou *T. matsutake* (Lian *et al.* 2006). Dans le cas de *L. amethystina* en forêt mature, on ne connaît pas cette concordance entre génets épigés et souterrains. La persistance végétative des génets, sans fructification mais avec une activité ectomycorhizienne souterraine, ne serait alors pas une phase de dormance, mais il s'agirait de **génets silencieux**, invisibles en surface.

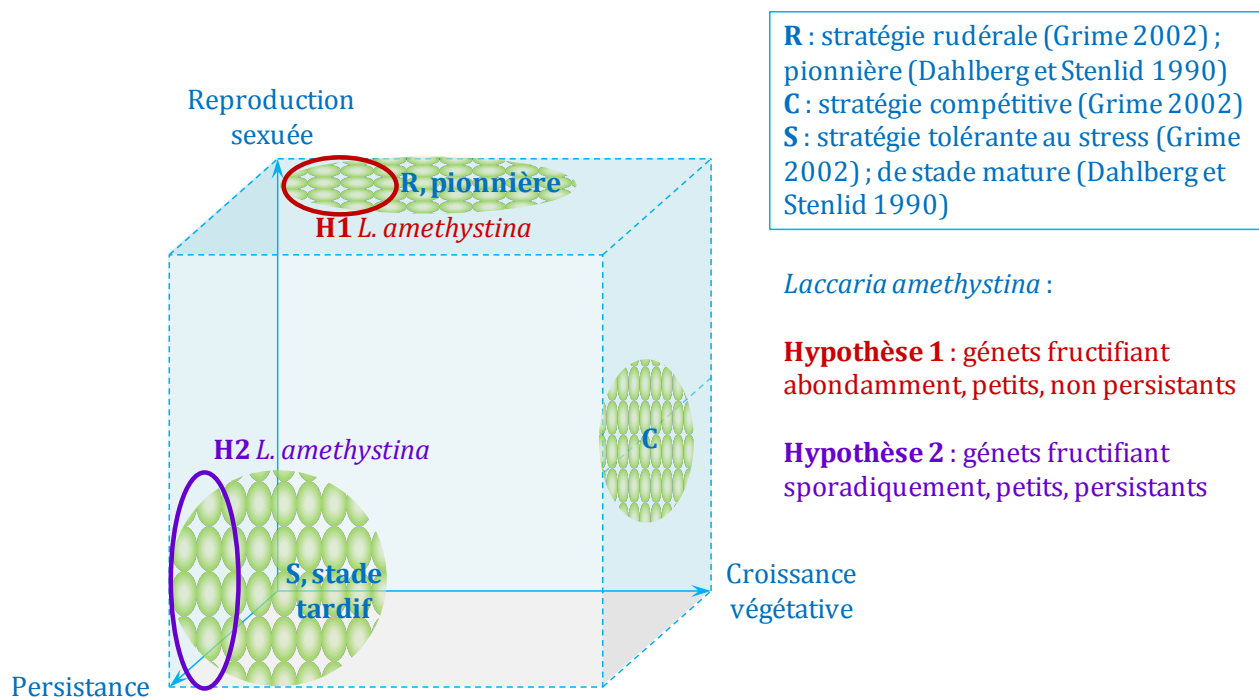


Figure 10: Stratégies écologiques de *L. amethystina*

L'existence de génets de stratégie tolérante au stress, persistants sans croissance végétative, remettrait en cause les approches d'estimation de l'**âge des individus** non par leur suivi, mais en déduisant de leur taille et de leur vitesse de croissance (généralement mesurée *in vitro*) leur date d'établissement (Dahlberg et Stenlid 1990, 1994 ; Baar *et al.* 1994 ; Bonello *et al.* 1998). La vitesse de croissance végétative des génets ectomycorhiziens pourrait, d'autre part, être affectés par des facteurs environnementaux, comme la disponibilité en ressources, mais aussi la **compétition inter- et intra-spécifique**. Chez *L. bicolor*, Selosse *et al.* (1998) ont suggéré un phénomène de compétition entre une souche introduite et des génets indigènes, limitant l'extension de chacun à la zone non infectée par l'autre. Chez *H. cylindrosporum*, deux génets principaux ont été observés sur un site par Gryta *et al.* (1997). Au fil des années, ils ont persisté et se sont étendus, mais sans se chevaucher, suggérant là aussi un cas de compétition entre les deux individus (Gryta *et al.* 2000 ; Guidot *et al.* 2002) d'une même espèce. Enfin, des exemples de compétition limitant la croissance de génets ectomycorhiziens ont été proposés également chez *Suillus grevillei* (Zhou *et al.* 2000) ou *Leccinum duriusculum* (Selosse 2003). Chez *L. amethystina*, l'extension mycélienne des génets pourrait effectivement être limitée par leur

forte densité (jusqu'à 13800 génets/ha), d'autant plus que ces génets s'observent souvent en zones, potentiellement de conditions environnementales favorables, où ils se concentrent (jusqu'à 16 génets sur 6 m² sur la placette 1 du Bois de Miquel). Des réactions d'incompatibilité somatique pourraient limiter l'extension du mycélium de deux génets se rencontrant, bien que cette exclusion spatiale ne semble pas totale (Figure 9 : les mycéliums de certains individus, déduits de la position des carpophores, semblent se chevaucher).

Un biais à prendre en compte dans les futures interprétations du suivi à long terme des fructifications de *L. amethystina* est la possible mésestimation de la taille des génets. Les marqueurs microsatellites sont codominants, peu sensibles à la contamination, et très répétables, il n'y a donc pas de risque de surestimer la diversité des populations. Mais à l'inverse, même avec un jeu de marqueurs qui semble suffisamment résolutif, des individus très fortement apparentés, pourraient ne pas être distinguables par ces marqueurs. Il serait alors possible d'assimiler en un génet des carpophores apparentés entre eux, et de surestimer la taille de ce génet. Ce biais technique pourrait peut-être, à assez court terme, être contourné grâce à la disponibilité du génome de *L. bicolor*, exploitable pour choisir de nouveaux marqueurs (SNP, par exemple). D'autre part, certains génets apparaissent avec une forme allongée sur la cartographie des placettes, et leurs carpophores sont souvent regroupés en bouquets espacés. Il pourrait s'agir de la séparation d'un génet initial en plusieurs ramets distincts, par fragmentation du mycélium. Il semble cependant que les placettes aient été peu perturbées pendant les 2 premières années de suivi (ni cueilleurs ni fousseurs apparents ; observation personnelle), et cette hypothèse impliquerait une fragmentation des génets antérieure aux relevés. Une autre possibilité d'explication de ces formes allongées serait la formation de rhizomorphes par certains génets (Raidl et Agerer 1992), permettant une croissance linéaire du mycélium et les échanges nutritifs dans ces génets longs.

Enfin, les **facteurs environnementaux** ou génétiques influant sur la **fructification** des champignons ectomycorhiziens sont encore méconnus, et il est difficile de prédire combien de temps un génet peut rester sans fructifier. Wadud (2007) suggère une relation entre la quantité de réserves d'un génet et sa capacité à fructifier. Il est à noter qu'un des 2 génets

persistants au Col de Faubel est le plus grand de l'année 2007 et a fructifié abondamment cette année-là, formant de nombreux bouquets de carpophores (sa surface atteint 1,56 m², avec 106 carpophores). L'étendue d'un génét pourrait faciliter sa persistance interannuelle sous forme de mycélium, et/ou sa production de carpophores dans des conditions favorables. Cependant, un champignon ectomycorhizien ne dispose pas d'organe de stockage de réserves, et sa nature symbiotique laisse supposer l'absence de mise en place de réserve, mais plutôt l'échange continu de nutriments au sein de son réseau mycélien. De façon générale, on connaît mal la relation entre la biomasse d'un organisme ectomycorhizien et sa fructification.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude de la dynamique pluriannuelle des populations de *L. amethystina* est d'apporter, par des suivis de fructification, des éléments de réponse quant à la stratégie écologique de cette espèce ectomycorhizienne en forêt mature : **pionnière, ou persistante ?** Les premiers résultats concordent avec ceux des études précédentes de Gherbi *et al.* (1999), Fiore-Donno et Martin (2001), mais nos interprétations diffèrent, et il est pour le moment impossible de conclure quant au régime de reproduction et à la stratégie écologiques des populations locales de *L. amethystina*. Il est par ailleurs possible que les stratégies écologiques R et S soient combinées chez ce modèle biologique, selon les conditions environnementales et les traits d'histoire de vie de chaque individu. Différents exemples d'espèces ectomycorhizienne existent, où petits et grands génets coexistent (*Pisolithus* sp., Anderson *et al.* 2001 ; *Amanita franchetii*, Redecker *et al.* 2001 ; *H. cylindrosporum*, Guidot *et al.* 2002) .

Un **suiti à long terme**, à l'échelle locale, des populations de *L. amethystina* permettra : (i) d'estimer précisément la part de génets longévifs, (ii) d'évaluer le potentiel de dispersion des spores, en relation avec la stratégie écologique de l'espèce, (iii) de considérer l'hypothèse d'une stratégie persistante S pour *L. amethystina* en s'appuyant sur les nouvelles données observées. Une hypothèse est la croissance lente des génets, potentiellement persistant silencieusement dans le sol à travers leur association mycorhizienne et fructifiant erratiquement selon des conditions environnementales particulières. Cette dynamique met en évidence la nécessité de

poursuivre les suivis de fructifications des populations à long terme, pour pallier au **manque d'accessibilité au mycélium** végétatif de *L. amethystina*. Des études sur le mycélium souterrain ou les mycorhizes sont possibles grâce aux techniques moléculaires. Cependant, elles demandent (i) des amorces d'amplification hautement spécifiques à l'espèce visée (Guidot *et al.* 2003 ; Wadud 2007 ; van der Linde 2009), et (ii) de prélever une fraction du milieu suivi à chaque échantillonnage ; cette stratégie pourrait s'avérer destructive dans le cadre d'un suivi à long terme et peu efficace chez *L. amethystina*, dont le mycélium souterrain semble peu abondant.

Notre suivi à long terme des populations locales de *L. amethystina* au Bois de Miquel pourrait, en plus de suivre la persistance et la vitesse d'expansion des génets, apporter des informations sur les processus de dispersion locales des spores et les facteurs régulant la fructification de cette espèce ectomycorhizienne en forêt mature. Enfin, ce suivi pluriannuel des individus permettra d'étudier ces populations à l'aide d'approches démographiques développées pour d'autres organismes, comme par exemple des modèles de capture-recapture (Jolly 1965), pour appréhender de façon plus complète la dynamique des populations locales de *L. amethystina*.

Tableau 6 : Principales caractéristiques écologiques d'espèces ectomycorhiziennes étudiées pour la dynamique locale de leurs populations

<i>Étude</i>	<i>Espèce fongique</i>	<i>Environnement forestier</i>	<i>Marqueurs et populations</i>	<i>Fructification (carpophores/ génét)</i>	<i>Croissance (taille des génets)</i>	<i>Capacité de persistance</i>	<i>Stratégie (*selon les auteurs, **selon les résultats)</i>
Dahlberg et Stenlid 1990	<i>Suillus bovinus</i>	<i>Pinus sylvestris</i> , 12 à 250 ans selon site	incompatibilité somatique 4 populations	71/36, 7/5, 14/1 et 8/2	moyennes : 0,7 m à 3,4 m ; maximales : 4,2 m à 30 m selon l'âge du site	36 ans	compétitive** : pionnière en forêt jeune et expansive en forêt mature
Baar <i>et al.</i> 1994	<i>Laccaria bicolor</i>	<i>P. sylvestris</i> , 17 ans	incompatibilité somatique 2 populations	23/4 et 13/3	maximale : 12,5 m	13 à 31 ans	compétitive**
Dahlberg et Stenlid 1994	<i>Suillus granulatus</i>	<i>P. sylvestris</i> , 12 à 250 ans selon site	incompatibilité somatique 5 populations	749/26, 121/6, 545/6, 549/25 et 146/6	moyennes : 0,8 m à 3,5 m ; maximales : 1,7 m à 16,5 m selon l'âge du site	35 ans	compétitive**
Gryta <i>et al.</i> 1997	<i>Hebeloma cylindrosporum</i>	<i>Pinus pinaster</i> , 10 à 60 ans selon site ; forêt ou dune	IGS-RFLP, mtDNA-RFLP 3 populations	26/11, 21/18 et 15/14	maximales : 3,6 m, 0,1 m et 0,15 m	pas de donnée	rudérale*
Anderson <i>et al.</i> 1998	<i>Pisolithus tinctorius</i>	peuplement de sclérophylles >16 ans	RAPD et RAMS 1 populations	45/33	moyenne : <1 m ; maximale : 7 à 30 m	pas de données	combinaison R, C, S**
Bonello <i>et al.</i> 1998	<i>Suillus pungens</i>	<i>Pinus muricata</i>	RAPD, AP-PCR 1 population, 2 ans	21/6	maximale : 40 m	40 ans	combinaison R, C, S*

Gherbi <i>et al.</i> 1999	<i>Laccaria amethystina</i>	<i>Fagus sylvatica</i> , 150 ans	RAMS, polymorphisme IGS et ITS 1 population, 3 ans	340/159, 827/159 et 87/70	moyenne : 0,29 m ; maximale : 2 m	au moins 2 ans	rudérale à un stade tardif de succession*
Sawyer <i>et al.</i> 1999	<i>Cortinarius rotundisporus</i>	<i>Ligustrum lucidum</i> , <i>L. sinense</i> , <i>Lantana camara</i>	MS-PCR, ITS-RFLP 3 populations	38/4, 32/2, 15/2	maximales : 9 à 30 m	pas de donnée	compétitive ou tolérante au stress *
Selosse <i>et al.</i> 1999	<i>L. bicolor</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	polymorphisme IGS, RAPD 1 population, 3 ans	31 /5, 100/12, 52/10 et 67/13	maximale : 3,3 m	au moins 3 ans	rudérale *
Gryta <i>et al.</i> 2000	<i>H. cylindrosporum</i>	<i>P. pinaster</i> , 10 à 20 ans	type sexuel, IGS- RFLP, mtDNA-RFLP et RAPD 1 population, 5 ans	213/2 à 60/6	maximale : 7 m	au moins 5 ans	persistance et croissance rapide*, stratégie compétitive **
Zhou <i>et al.</i> 2000	<i>Suillus grevillei</i>	<i>Larix kaempferii</i> , <i>P. densiflora</i> , 35 à 85 ans	ISSR 2 populations, 2 ans	77/35 et 52/17	moyennes : 0,7 m à 2,3 m ; maximales : 7 m à 11 m	au moins 2 ans	persistante fructifiant sporadiquement*
Anderson <i>et al.</i> 2001	<i>Pisolithus cf. alba</i> et <i>P. cf. marmoratus</i>	peuplement de sclérophylles	ISSR 2 populations, 3 ans	48/20 et 67/25 (<i>P. cf. alba</i>) ; 18/1 (<i>P. cf. marmoratus</i>)	moyenne : <1 m ; maximales : 12 à 30 m	au moins 3 ans	combinaison R, C, S* (<i>P. cf. alba</i>)

Fiore-Donno et Martin 2001	<i>L. amethystina</i> , <i>Xerocomus</i> <i>chrysenteron</i> , <i>X. pruinatus</i>	<i>P. abies</i> et <i>F.</i> <i>sylvatica</i> , 40 à 150 ans	RAPD, polymorphisme IGS et ITS 1 population, 3 ans	44/36, 90/69 et 75/52 (<i>L. amethystina</i>) ; 39/1, 56/1 et 51/1 (<i>X. chrysenteron</i>) ; 7/1, 2/1 et 1/1 (<i>X. pruinatus</i>)	moyenne : 1,1 m ; maximale : 5,4 m (<i>L. amethystina</i>) ; 110 m (<i>X. chrysenteron</i>) ; 10 m (<i>X. pruinatus</i>)	au moins 2 ans (<i>L. amethystina</i>) ; au moins 3 ans (<i>X. chrysenteron</i> et <i>X. pruinatus</i>)	rudérale à un stade tardif de succession* (<i>L. amethystina</i>) ; tolérante au stress** (<i>X. chrysenteron</i> et <i>X. pruinatus</i>)
Redecker <i>et al.</i> 2001	<i>Lactarius</i> <i>xanthogalactus</i> , <i>Russula</i> <i>cremoricolor</i> , <i>Amanita franchetii</i>	<i>P. menziesii</i> , <i>Lithocarpus</i> <i>densiflora</i> , <i>P. muricata</i> , 40 et 50ans	ITS-RLFP, AFLP 3, 2 et 1 populations, 2 ans	75/46 et 6/3 (<i>L. xanthogalactus</i>), 77/69, 8/8 et 24/21 (<i>R. cremoricolor</i>), 22/11 (<i>A. franchetii</i>)	maximales : 7,3 m (<i>L. xanthogalactus</i>), 12 m (<i>R. cremoricolor</i>), 4,7 m (<i>A. franchetii</i>)	<2 ans	rudérale à un stade tardif de succession*
Bergemann et Miller 2002	<i>Russula brevipes</i>	<i>Pinus contorta</i> , 100 ans, <i>Picea</i> <i>sitchensis</i> , 40 à 60 ans	3 microsatellites 1 population	33/9 et 23/7	moyenne : <3 m ; maximale : 18 m	11 ans	combinaison C, S**
Guidot <i>et al.</i> 2002	<i>H. cylindrosporum</i>	<i>P. pinaster</i> , 10 à 20 ans, 20 à 25 ans et 50 à 60 ans ; forêt ou dune	IGS2-RFLP 5 populations, 5 ans	352/31 (dune) et 143/91 (forêt)	moyenne : 0,18 m (dune) et 0,48 m (forêt)	au moins 5 ans (dune), <2 ans (forêt)	compétitive** (dune) ou rudérale** (forêt)
Dunham <i>et al.</i> 2003	<i>Cantharellus</i> <i>formosus</i>	<i>P. menziesii</i> , <i>Tsuga</i> <i>heterophylla</i> , 40 à 60 ans	5 microsatellites, ITS-RFLP 18 populations	285/45	moyenne : 3,2 m ; maximale : 13 m	pas de donnée	pionnière**
Selosse 2003	<i>Leccinum</i> <i>duriusculum</i>	<i>Populus alba</i> <20 et 70 ans	RAPD, LrDNA et ITS 3 populations, 3 ans	57/2, 24/5 et 31/6	maximales : 15 m, 4 m et 5 m	au moins 3 ans	pionnière**

Kretzer <i>et al.</i> 2004	<i>Rhizopogon vesiculosus</i> , <i>R. vinicolor</i>	<i>P. menziesii</i> , <i>T. heterophylla</i> , <i>T. plicata</i> , 80 ans	11 microsatellites, ITS-RFLP 2 populations	15/4 et 15/1 (<i>R. vesiculosus</i>), 15/3 (<i>R. vinicolor</i>)	maximales : 13,5 m (<i>R. vesiculosus</i>), 2 m (<i>R. vinicolor</i>)	pas de donnée	a priori rudérale , infirmée par les résultats*
Bergemann <i>et al.</i> 2006	<i>R. brevipes</i>	<i>Quercus douglasii</i> , <i>Q. wizensii</i> , <i>Pinus sabiniana</i>	6 microsatellites 3 populations, 2 ans	57/36, 36/20 et 32/15	pas de données	au moins 2 ans	persistante* , dispersion par mycophagie > 1000 m
Gryta <i>et al.</i> 2006	<i>Tricholoma populinum</i> , <i>T. scalpturatum</i>	<i>Populus nigra</i> , 20 et 25 ans	RAPD, ISSR, IGS2-RFLP 2 populations, 3 ans	24/7 et 95/13 (<i>T. populinum</i> , site perturbé ou non) ; 76/58 et 296/141 (<i>T. scalpturatum</i> , site perturbé ou non)	maximales : 1,8 m et 11,5 m (<i>T. populinum</i> , site perturbé ou non) ; 0,35 m et 9,5 m (<i>T. scalpturatum</i>)	au moins 2 ans (<i>T. populinum</i> , site non perturbé)	persistante* (<i>T. populinum</i> , site non perturbé) ou compétitive* (<i>T. populinum</i> , site perturbé)
Lian <i>et al.</i> 2006	<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>P. densiflora</i> , 85 ans	4 microsatellites, ITS-RFLP 6 populations, 3 ans	280/38	moyenne : 2 m ; maximale : 11,5 m	au moins 3 ans	tolérante au stress** (persistance et croissance lente)
Wadud 2007	<i>L. amethystina</i> et <i>L. laccata</i>	<i>Salix reinii</i> , <300 ans	10 et 5 microsatellites 1 population, 3 ans	561/44 (<i>L.</i> <i>amethystina</i>) et 612/ 55 (<i>L. laccata</i>)	moyenne : 0,35 m ; maximale : 1,20 m (<i>L. amethystina</i>) moyenne : 0,23m ; maximale : 1,40 m (<i>L. laccata</i>)	au moins 3 ans (<i>L.</i> <i>amethystina</i> et <i>L.</i> <i>laccata</i>)	pionnières et persistantes en milieu jeune*
Carriconde <i>et al.</i> 2008	<i>T. scalpturatum</i>	<i>Quercus pubescens</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. abies</i> , 35 ans	ISSR, IGS2-RFLP 4 populations, 3 ans	125/15, 156/96, 94/53 et 98/78	moyennes : 0,23 m à 0,57 m ; maximale : 40 m	<2 ans (sauf 2 génets : 20 à 65 ans)	rudérale*

CHAPITRE III

Des populations locales à l'aire de répartition globale

III.1. Estimer les flux de gènes pour comprendre les interactions entre les populations

Les études de populations locales de *L. amethystina* permettent de mieux connaître la biologie et la dynamique locale de ce champignon, mais que se passe-t-il à plus grande échelle ? Cette espèce a une aire de répartition géographique large, et la multiplication d'études locales, concernant des conditions environnementales très particulières et non un continuum d'habitats, ne permet pas d'accéder aux facteurs structurant les populations et leurs interactions.

L'étude des flux de gènes entre populations est un moyen de décrire les échanges entre les populations (Chapitre I). Chez les champignons basidiomycètes, les migrations ne sont, en général, pas réalisés par les individus d'une génération donnée, mais par leur descendance sous forme de basidiospores. L'estimation des flux de gènes permet donc aussi de décrire les capacités de dispersion des basidiospores, alors que cette capacité est difficile à estimer par l'observation directe des spores (James et Vilgalys 2001 ; Millington et Corden 2005).

Les facteurs structurant les populations peuvent être liés à la biologie de l'espèce (son régime de reproduction, le mode de dispersion de ses spores, par exemple), mais aussi à son environnement (des barrières géographiques, des milieux plus ou moins favorables à l'établissement des spores). À des échelles modérées, les conditions environnementales peuvent jouer un rôle dans la structure entre les populations ectomycorhiziennes. Jany *et al.* (2002) ont par exemple observé, entre populations de mêmes sites, un niveau de différenciation suggérant un effet des caractéristiques édaphiques sur la structure des populations. Chez *S. luteus* en revanche, des conditions édaphiques particulièrement contrastées (sites pollués ou non par des métaux lourds) ont un effet limité sur la structure génétique des populations (Muller 2004, 2007). Les auteurs suggèrent l'importance de la reproduction sexuée et des flux de gènes entre populations, qui permettrait l'évolution rapide de la tolérance à la pollution tout en maintenant des niveaux élevés de diversité génétique au sein des populations. Le niveau de perturbation de l'habitat peut aussi influencer sur la structure locale des populations, comme chez *H. cylindrosporum* (Guidot *et al.* 2003) ou *Tricholoma* sp. (Gryta *et al.* 2006 ; Tableau 6).

Les populations d'espèces ectomycorhiziennes montrent ainsi des capacités d'**adaptation locale** à des facteurs environnementaux abiotiques. Leur association symbiotique pourrait également être impliquée dans leur structure fine. Même si la plupart de ces espèces sont considérées comme généralistes (Smith et Read 2009), les peuplements d'hôtes sont variables, notamment en âge et en composition en espèces, et pourraient impliquer une spécialisation de leurs partenaires ectomycorhiziens, invisible morphologiquement.

Un autre facteur de différenciation par l'environnement, potentiellement plus puissant et plus constant que les variations biotiques et abiotiques du milieu, est l'**isolement par la distance** entre les populations. Comme nous le soulignons dans l'article de revue des études de génétique des populations de champignons ectomycorhiziens (Douhan *et al.* en préparation), bien que la migration, par la dispersion des spores pour les champignons ectomycorhiziens, soit un processus majeur façonnant la structure génétique des populations et participant au maintien de leur diversité, peu d'études sont consacrées aux flux de gènes entre les populations de ces espèces fongiques. La plupart s'intéressent à des populations distantes de moins de 1000 km, décrivant leur structure génétique spatiale sur une petite partie seulement de l'aire de répartition des espèces (Tableau 7).

Les premières études ne donnent pas toujours d'estimateurs de flux génique, mais analysent les distances entre les populations par la méthode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean* (UPGMA), regroupant hiérarchiquement les individus les plus proches génétiquement et permettant de faire ressortir des groupes géographiques plus ou moins évidents (Jany *et al.* 2002 ; Wu *et al.* 2005). Par la suite, les analyses de données ont estimé les flux géniques à l'aide d'indices de différenciation entre paires de populations (F_{ST} , Φ_{ST} , θ_{ST} ; Chapitre I ; Tableau 7) ; l'isolement par la distance a été testé sur des distances variées, par autocorrélation spatiale pour une échelle locale (Kretzer *et al.* 2005), ou par des tests de Mantel, recherchant des corrélations entre les distances génétiques ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) et les distances géographiques (Tableau 7). Amend *et al.* (2009b), de façon originale, utilisent même la recherche d'isolement par la distance entre des populations de *T. matsutake* dans les lits du Mekong et du Yangtse (Yunnan) avec une l'approche de génétique du paysage (Encadré 1). Les auteurs comparent les impacts respectifs des distances euclidiennes (en ligne droite entre

deux points donnés) et des « distances du paysage » (des distances géographiques pondérées par la topologie du paysage) sur la distance génétique des populations ; ils montrent une absence d'isolement par la distance géographique simple, mais un test de Mantel significatif pour les distances du paysage ($r=0,57$, $p=0,002$). Cette étude suggère une dispersion efficace (dispersion puis établissement) des spores de *T. matsutake* possible à longue distance, mais limitée aux couloirs formés entre les montagnes par les lits des deux fleuves. Les quelques études de structure génétique spatiale de populations ectomycorhiziennes font émerger des patrons de flux géniques variés, reflétant la dispersion des spores par les mycophages ou le vent généralement (voire les avalanches pour *C. geophilum*, Wu *et al.* 2005 ; Tableau 7). Ces études mettent également en évidence certaines barrières à la dispersion ; la distance géographique limite rapidement la dispersion des spores pour des espèces dispersées par les animaux, comme *C. geophilum* (Jany *et al.* 2002), *R. brevipes* (Bergemann *et al.* 2006), ou *Rhizopogon* sp. (Kretzer *et al.* 2005). Des barrières géographiques peuvent aussi créer des obstacles à la dispersion de spores par le vent et à leur établissement dans un milieu favorable, comme les Montagnes Rocheuses isolant des populations américaines de *R. brevipes* (Bergemann et Miller 2002) ou les montagnes du Yunnan en Chine pour *T. matsutake* (Amend *et al.* 2009b).

L. amethystina est une espèce décrite en Europe et en Asie, considérée comme généraliste, car observée sous une large gamme d'hôtes et des forêts de diverses maturités. Les différents suivis de fructifications montrent une forte diversité génétique des populations, qui pourrait refléter une **spécificité cryptique** locale, par exemple liée à l'espèce hôte ou à l'âge de la forêt. Au cours de ma thèse, l'étude de Roy *et al.* (2008) a testé l'existence d'une structure génétique entre les populations de *L. amethystina* liée au peuplement, et l'importance des flux géniques entre ses populations françaises à une échelle modérée (450 km). Puis nous avons élargi notre fenêtre d'étude aux populations du continent européen (de l'Espagne à la Finlande, 2900 km) jusqu'à l'autre extrémité de l'aire de répartition théorique de *L. amethystina*, le Japon. Cette approche nous a permis de caractériser des processus structurant les populations, locaux et inter-populationnels, en prenant en compte les potentielles barrières à la dispersion et aux flux de gènes, comme les distances géographiques mais aussi des facteurs environnementaux.

Tableau 7 : Principales caractéristiques de structure géographique spatiale entre populations de champignons ectomycorhiziens. En gras : cas de différenciation significative entre des populations éloignées

<i>Étude</i>	<i>Ectomycorhize / hôte et zone géographique</i>	<i>Répartition des populations</i>	<i>Marqueurs génétiques et échantillons</i>	<i>Diversité intra-populations</i>	<i>Flux de gènes</i>	<i>Isolement par la distance</i>	<i>Dispersion supposée</i>
Bergemann <i>et al.</i> 2006	<i>Russula brevipes</i> / hôtes variés, Californie, États-Unis	3 populations, 1,1 km	microsatellites, 124 échantillons (carpophores)	diversités génotypiques : 0,47 à 0,63	$\theta_{ST}=0,00$ à 0,004	non ($r=0,66$, $p=0,51$)	par les mycophages, à faible distance
Wu <i>et al.</i> 2005	<i>Cenococcum geophilum</i> / <i>Salix reinii</i> , désert des pentes du Mont Fuji, Japon	4 populations, 5 km	microsatellites 311 échantillons (carpophores)	diversités génotypiques : de 0,13 à 0,53	pas de donnée ; analyse UPGMA	pas de test	par les avalanches
Kretzer <i>et al.</i> 2005	<i>Rhizopogon vinicolor</i> et <i>R. vesiculosus</i> / <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Tsuga heterophylla</i> , <i>Thuja plicata</i> , Oregon, États-Unis	3 populations, 5,5 km	ITS-RFLP, microsatellites 103 et 145 échantillons (mycorhizes, carpophores)	diversités génotypiques : 0,94 et 0,58	$\Phi_{ST}=-0,002$ à 0,022 (<i>R. vinicolor</i>) ; $\Phi_{ST}=0,01$ à 0,078 (<i>R. vesiculosus</i>)	pas d'autocorrélation spatiale (<i>R. vinicolor</i>) ; autocorrélation spatiale positive (<i>R. vesiculosus</i>)	par les mycophages, à faible distance (25 m pour <i>R. vesiculosus</i>)
Muller <i>et al.</i> 2007	<i>Suillus luteus</i> / hôtes variés, district de Limburg, Belgique	9 populations, 28 km	microsatellites, 164 échantillons (carpophores)	F_{IS} : de 0,02 à 0,22	R_{ST} : négatif à 0,121	pas de test	par les mycophages ou le vent
Amend <i>et al.</i> 2009a	<i>Tricholoma matsutake</i> / <i>Pinus</i> sp. et <i>Quercus</i> sp., Yunnan, Chine	2 populations, 70 km	SNP 59 échantillons (mycorhizes)	diversités génotypiques : 0,78 à 0,88	F_{ST} : 0,01	pas de test	anémochore (>70 km)
Jany <i>et al.</i> 2002	<i>C. geophilum</i> / <i>Fagus sylvatica</i> , Nord-Est de la France	5 populations, 250 km	ITS-RFLP, SCAR, RAPD 215 échantillons (mycorhizes, sclérotés)	diversités génotypiques : de 0,04 à 0,13	pas de donnée ; analyse UPGMA	oui (test de Mantel : $r=0,49$; $p<0,001$)	par les mycophages, à faible distance

Amend <i>et al.</i> 2009b	<i>Tricholoma matsutake</i> / <i>Quercus</i> sp., Yunnan, Chine (lits du Mekong et du Yangtse)	8 populations, 256 km	SNP 209 échantillons (carpophores)	diversités génotypiques : de 0,74 à 0,95	F_{ST} : de 0,001 à 0,112	isolement par le paysage (test de Mantel : $r=0,57$, $p=0,002$) mais pas par la distance ($p=0,12$)	anémochore, limitée par la topographie
Roy <i>et al.</i> 2008	<i>Laccaria amethystina</i> / hôtes variés, France	3 populations, 450 km	IGS, DALP, microsatellites 497 échantillons (carpophores)	F_{IS} : de 0,25 à 0,39	F_{ST} : de 0,018 à 0,029	non (test de Mantel : $r=0,12$, $p=0,63$)	anémochore, à longue distance (450 km)
Xu <i>et al.</i> 2008	<i>T. matsutake</i> / hôtes variés, Yunnan et Sichuan, Chine	17 populations, 1050 km	RFLP, SNP 154 échantillons (carpophores)	diversités génotypiques : de 0,58 à 0,97	F_{ST} : de 0,007 à 0,232	oui (test de Mantel : $r=0,32$, $p=0,03$)	anémochore ? limites inconnues
Bergemann et Miller 2002	<i>R. brevipes</i> / <i>Pinus</i> <i>contorta</i> et <i>Picea</i> <i>sitchensis</i> , Wyoming et Californie, États-Unis	2 populations, 1500 km	microsatellites, 56 échantillons (carpophores)	F_{IS} : 0,151 et -0,080	F_{ST} : 0,434	pas de test	anémochore, limitée par la topographie
Vincenot <i>et</i> <i>al.</i> en préparation	<i>Laccaria amethystina</i> / hôtes variés, Europe (de l'Espagne à la Finlande)	16 populations, 2900 km	microsatellites 587 échantillons (carpophores)	F_{IS} : de 0,18 à 0,49	F_{ST} : de 0,001 à 0,134	non (test de Mantel : $r=0,098$, $p=0,056$)	anémochore, à longue distance (2900 km)

III.2. Les populations de *Laccaria amethystina* à l'échelle française

L'article '*Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont*', co-écrit par Mélanie Roy, Marie-Pierre Dubois, Magali Proffit, Lucie Vincenot, Erick Desmarais et Marc-André Selosse (publié en 2008 dans *Molecular Ecology*) s'attache à la fois à la question du généralisme de *L. amethystina* envers ses hôtes, et aux flux de gènes existant entre populations à l'échelle de la France. En effet, comme de nombreux autres champignons ectomycorhiziens, cette espèce est considérée comme capable de s'associer, à un large spectre d'hôtes des forêts tempérées, parfois simultanément. Cette hypothèse biologique n'avait jamais été démontrée, mais émerge simplement de multiples observations des fructifications du laccaire directement sous des essences variées.

Une spécialisation à l'hôte pourrait cependant exister, avec des espèces cryptiques non observables par la morphologie par exemple. Afin de détecter des traces de spécialisation par l'hôte, nous avons décrit, à l'aide de marqueurs génétiques neutres, la structure génétique de populations de *L. amethystina* associées à une ou deux espèces hôtes caractérisées (*Fagus sylvatica*, *Abies alba*, *Castanea sativa*, *Carpinus betulus* et *Quercus robur*). Nous avons comparé cette potentielle structure inter-populations liée à une spécialisation par l'hôte à la structure induite entre les populations par la distance géographique, grâce à l'échantillonnage de populations dans trois forêts françaises (Bellême, Orry et Pilat, éloignées de 150 à 450 km), et quantifié la part de variabilité génétique due à chacun des facteurs.

L'analyse des données, sur 497 carpophores appartenant à 11 populations, a montré une faible différenciation génétique entre la plupart des populations ; exceptées 3 populations, toutes les autres présentent des indices de différenciation génétique entre elles faibles ($F_{ST} < 0,10$). Ces résultats indiquent une très faible différenciation par l'hôte ($F_{ST} = 0,01$ en moyenne entre populations d'hôtes différents). Le facteur hôte n'explique donc pas la variabilité génétique entre populations. Il apparaît également que la distance géographique ne joue pas non plus un rôle structurant fort : la différenciation maximale entre les populations de deux forêts différentes est de 0,029, et un test de Mantel montre clairement l'absence d'un patron d'isolement par la distance sur 450 km ($r^2=0,015$, $p=0,63$).

En mettant en évidence l'absence de contribution de l'espèce hôte à la structure génétique des populations de *L. amethystina*, nous avons apporté une démonstration du caractère généraliste de cette espèce ectomycorhizienne envers ses hôtes. D'autre part, nous avons observé le faible niveau de structure géographique spatiale de ses populations en France. L'absence de différenciation génétique des populations à cette distance a été un résultat surprenant. En effet, elle met en évidence des flux géniques – permis par l'échange de spores entre populations – à l'échelle de 450 km, alors que nous ne connaissons pas les capacités de dispersion de l'espèce. Au-delà de tester le caractère généraliste de l'association de *L. amethystina* avec ses hôtes, cette étude a ouvert la voie à la caractérisation des flux géniques entre les populations de cette espèce à des échelles beaucoup plus larges, du continent européen à son aire de répartition.

Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont

MELANIE ROY,* MARIE-PIERRE DUBOIS,* MAGALI PROFFIT,* LUCIE VINCENOT,* ERICK DESMARAIS† & MARC-ANDRE SELOSSE*

*Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CNRS, UMR 5175), Département Biologie des Populations, Equipe Interactions Biotiques 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France, †Institut des Sciences de l'Evolution (ISEM, UMR 5554), Equipe Biologie Intégrative, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France

Abstract

It is commonly assumed that ectomycorrhizal (ECM) fungi associated with temperate forest tree roots are not host-specific. Because this assumption relies on species delineations based on fruitbodies morphology or ribosomal DNA sequences, host-specific, cryptic biological species cannot be ruled out. To demonstrate that *Laccaria amethystina* has true generalist abilities, we sampled 510 fruitbodies on three French sites situated 150–450 km away from each other. At each site, populations from monospecific stands (*Abies alba*, *Castanea europea* and *Fagus sylvatica*) or mixed stands (*F. sylvatica* + *Quercus robur* or *Q. robur* + *Carpinus betulus*) were sampled. Three different sets of markers were used for genotyping: (i) five microsatellite loci plus the ribosomal DNA intergenic spacer, (ii) the mitochondrial large ribosomal DNA subunit, and (iii) direct amplification of length polymorphism (DALP), a new method for fungi providing dominant markers. Evidence for allogamous populations (with possible inbreeding at local scale) and possibly for biparental mitochondrial inheritance was found. All markers congruently demonstrated that *L. amethystina* populations show little structure at this geographical scale, indicating high gene flow (as many as 50% of founding spores in all populations being of external origin). Our results also showed that host species contributed even less to population differentiation, and there was no evidence for cryptic biological species. This first *in situ* demonstration of a true multihost ability in an ECM species is discussed in terms of ecology and evolutionary biology.

Keywords: ectomycorrhizal fungi, gene flow, host specificity, microsatellite loci, ribosomal DNA, temperate forest

Received 7 December 2007; revision received 24 February 2008; accepted 7 April 2008

Introduction

In temperate forests, tree roots associate with soil fungi to form the ectomycorrhizal (ECM) symbiosis, which has a crucial contribution to the nutrition of both partners and to forest ecosystem functioning (Smith & Read 1997). The ECM symbiosis is considered nonspecific, since most ECM fungi colonize several host species and are thus generalists ('multihost fungi', Bruns *et al.* 2002). Reciprocally, ECM plants associate with various fungal species (Selosse *et al.*

2006). Although specialist (single-host) ECM taxa exist, such as in *Leccinum* (den Bakker *et al.* 2004) or *Alnicola* (Moreau *et al.* 2006), multihost ECM fungi comprise between 12% and 90% of ECM fungal communities (Kennedy *et al.* 2003; Richard *et al.* 2005; Twieg *et al.* 2007). The ecological significance of this is that even if multihost fungi are present at low frequencies, the connection of roots of different plants by multihost mycorrhizal fungi might drastically affect plant communities (Selosse *et al.* 2006), e.g. by providing pathways for interspecific transfers of carbon (Tedersoo *et al.* 2007) or mediating competitive interactions between plants (Bever 2002). Multihost ECM fungi may contribute to ecological

Correspondence: M.-A. Selosse. Fax: (33) (0)467 412138; E-mail: ma.selosse@wanadoo.fr

succession, as in Mediterranean ecosystems, where shrubs associated with ECM fungi likely facilitate the establishment of ECM trees, by functioning as inoculum reservoirs (Richard *et al.* 2005).

However, evidence for multihost ECM fungi relies on questionable definitions of the fungal species. A classical approach is based on a morphological definition (morphospecies). The occurrence of fruitbodies (the sporulating organ formed by many ECM fungi) with identical morphology under various host trees is considered as an evidence that the species is multihost. More recently, molecular approaches assume that identical DNA sequences (e.g. the internal transcribed rDNA spacer, ITS) equate to identical species. Indeed, there is good congruence between ITS sequence and morphospecies (Horton 2002), but both approaches potentially overlook cryptic host-specificity. Phylogenetically related but genetically isolated species that would be host-specific could retain similar ancestral fruitbody morphology and ITS sequence, while preventing any gene flow, leading to cryptic biological species (CBS). Interestingly, in the *Leccinum* genus, where species differ by host specificity, interspecific morphological differences are limited (den Bakker *et al.* 2004). Similarly, ITS divergence might not fully correlate with biological species, if sequences diverge only after genetic isolation, as suggested in ECM *Hebeloma* spp. (Aanen *et al.* 2000). Moreover, direct evidence that an ECM fungal genet simultaneously associates with two host species is so far limited to (i) *ex situ* inoculation experiments, where experimental conditions might allow artefactual associations (Selosse *et al.* 2006), and (ii) rare *in situ* genotypings based on a single locus (Taylor & Bruns 1997; Selosse *et al.* 2002). Although multihost ability in ECM fungi is probably the rule, it still awaits rigorous demonstration.

Species definition and speciation are debated for fungi (Kohn 2005; Taylor *et al.* 2006), but CBSs are often described within morphospecies. Lack of recombination can be demonstrated by (i) *in vitro* mating tests between haploids, (ii) study of gene flow, or (iii) analyses of multigene phylogenies (phylogenetic species recognition; Taylor *et al.* 2000). Ecological specialization is a driving force in sympatric fungal speciation (Kohn 2005), and host specialization correlates with CBSs in many parasitic taxa, such as the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* on Caryophyllaceae species (Le Gac *et al.* 2007), or the root rot fungus *Heterobasidion annosum* on spruce, pine and silver fir (Gonthier *et al.* 2001). Host specificity could also drive speciation among ECM basidiomycetes, as proposed in the *Hebeloma crustuliniforme* species complex (Aanen *et al.* 2000), among *Xerocomus* spp. (Taylor *et al.* 2007), or among the suilloids (Kretzer *et al.* 1996). Moreover, even without relationship to host preference, CBSs are frequently reported among ECM fungi, such as *Pisolithus tinctorius* (Martin *et al.* 2002), *Cantharellus formosus* (Dunham *et al.* 2006), *Cenococcum*

geophilum (Douhan & Rizzo 2005), *Tricholoma scalpturatum* (Gryta *et al.* 2006) or *Amanita muscaria* (Geml *et al.* 2006). CBSs seem to occur in most investigated morphospecies, even if this may result from underreporting of models lacking cryptic speciation. Arguably, fungal species have fewer morphological characters than macro-organisms, and speciation could less impact morphology (Taylor *et al.* 2006). Thus, closer investigation of supposedly multihost ECM fungi is required to rule out the possibility of host-specific CBSs — and this is the aim of the present work.

Analysis of gene flow in natural populations can assess whether a supposed 'species' is a single breeding unit, or is divided into several CBSs (Grünig *et al.* 2007), circumventing mating tests for uncultivable strains. We focused on *Laccaria amethystina*, an uncultivable, common species from Eurasian forests, belonging to a genus for which host specificity seems rare (Kropp & Mueller 1999). Two previous investigations of beech forest populations suggested that *L. amethystina* populations largely outcross, allowing for gene flow between populations (Gherbi *et al.* 1999; Fiore-Donno & Martin 2001). Here, we test whether *L. amethystina* populations under different host trees (including deciduous and coniferous species) show genetic differentiation by using two independent sets of nuclear markers and a mitochondrial marker. Since isolation by distance might generate genetic variation between populations independently of the host (Bergemann & Miller 2002), and since no data are currently available at scales above 50 m, we also investigated population genetic structure at two scale magnitudes, namely 1 km and 100 km. By analysing populations from three different forest sites in France, we tested whether host tree species contribute more to population genetic structure than geographical distance.

Materials and methods

Model species

Laccaria amethystina (Cooke) is a typical basidiomycetous species, where the dikaryotic mycelium (diploid thallus arisen from mating, whose cells harbour pairs of different haploid nuclei) grows vegetatively. It colonizes roots and forms above-ground fruitbodies bearing meiotic spores (Moore & Novak Fraser 2002). Establishment of these haploid spores, followed by mating, creates new dikaryotic mycelia. Dikaryotic genets can thus be typed by way of fruitbody analysis.

Sampling and DNA extraction

A total of 510 fruitbodies of *L. amethystina* were collected in fall 2001 from three different French forests situated from 150 to 450 km away from each other (Fig. 1a). In each forest, we chose stands with only one tree species (*Abies alba*,

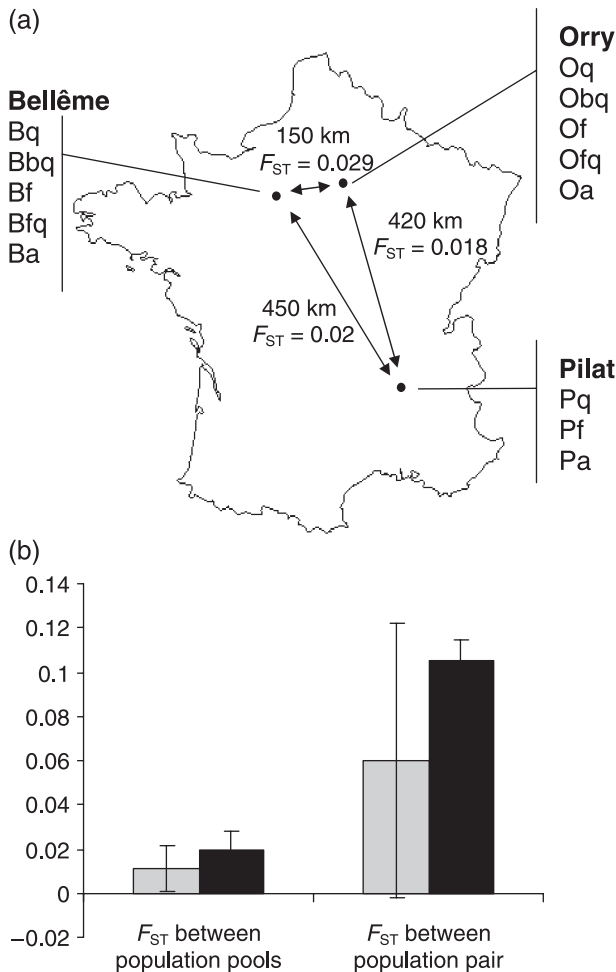


Fig. 1 The investigated French populations. (a) location of the three investigated French forests, with F_{ST} values and distances between them. (b) F_{ST} values between populations from different host trees and from different forest. On the right, comparison of means ($\pm$ standard deviation) of F_{ST} calculated between populations pooled from the same host tree (grey) and from the same forest (black). On the left, comparison of means ($\pm$ standard deviation) of F_{ST} calculated between pairs of populations differing by host (grey) or by forest of origin (black).

Castanea europaea or *Fagus sylvatica*) or a mix of two species exclusively (*Fagus sylvatica* + *Quercus robur* or *Q. robur* + *Carpinus betulus*), where we collected our populations. The 13 resulting populations, distributed across the three forests, were located at less than 2.5 km away from the other in each forest (minimal distance: 0.5 km; see Table 1 for the populations' names). Since average and maximal genet diameter found in previous studies were 0.65 m and 1.5 m (Gherbi *et al.* 1999) and 1.1 m and 5.4 m (Fiore-Donno & Martin 2001), respectively, we collected fruitbodies situated at more than 1.5 m from each other to limit redundant sampling of the same genet. Fruitbodies

were stored at -20°C within 3 h of collection. Eight French dried fruitbodies of other *Laccaria* spp. provided by P.-A. Moreau were used as outgroups in our analyses: *L. laccata* var. *pseudobicolor* [PAM01042909], *L. laccata* var. *moelleri* [PAM97090101], *L. laccata* var. *pallidifolia* [PAM01043006], *L. oblongispora* [PAM01042805], *L. macrocystidiata* [PAM99082801 and PAM00103002] and *L. proxima* [PAM01102404 and PAM01110104] (numbers are accessions in P.-A. Moreau herbarium at Université de Lille). For DNA extraction, 100 mg fruitbody pieces were ground in 1.5-mL Eppendorf tubes using 1.1-mm diameter Tungsten carbide balls (Biospec Products) in a Retch MM301 vortexer at 30 Hz for 2.5 min. Extraction was performed using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. DNA was recovered in 100 μL distilled water. Sequencing of ITS of 70 randomly chosen fruitbodies provided five different sequence types (GenBank Accession nos EU076450–EU076454), diverging by only 1- to 2-point mutations and uncorrelated to host or forest of origin.

Microsatellites and IGS markers

Microsatellites were characterized as in Sarthou *et al.* (2003), using a genomic library derived from a pool of two Orry fruitbodies. After screening of about 3000 colonies using the oligonucleotides $(\text{TC})_{10}$, $(\text{TG})_{10}$, $(\text{CAC})_5\text{CA}$, $\text{CT}(\text{CCT})_5$, $\text{CT}(\text{ATCT})_6$ and $(\text{TGTA})_6\text{TG}$, a total of 34 positive clones were sequenced. Microsatellite repeats were present in 17 loci (EF444487–444503). Flanking primer pairs were designed using the PRIMER 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi; Sarthou *et al.* 2003), and tested on 45 randomly selected samples from the three investigated forests (15 from each forest) for repeatability and polymorphism of patterns. Only La171 (EF444487) and La115 (EF444488) fitted these criteria (Table 2). These samples were used to screen 10 loci obtained by Wadud *et al.* (2006) from Japanese *L. amethystina* and seven loci obtained by Jany *et al.* (2006) from American *L. bicolor*. We, respectively, selected the markers La03, La06, La17, La21 and La23 from Wadud *et al.* (2006) and LBTC38 from Jany *et al.* (2006) (Table 2).

We also used the intergenic spacer 1 (IGS1) of the rDNA that provides an amplicon polymorphic in size when using primers CNL12 + 5SA (Selosse *et al.* 1996) and behaves as a Mendelian locus (Selosse *et al.* 1996, 1998). In order to multiplex it with microsatellites, the amplicon size was reduced by designing a primer internal to IGS1. Briefly, we found a conserved IGS1 region in which the primer IGA was designed (Fig. S1a, Supplementary material; Table 2). The fragment amplified using IGA and 5SA, flanking the 5.8S rDNA, contains all the IGS1 size polymorphism [data not shown; polymerase chain reaction (PCR) conditions as in Selosse *et al.* 1996].

Table 1 Features, names and locations of the *Laccaria amethystina* populations under study. Populations were named with a first letter to identify the forest (P, B or O) followed by letter(s) identifying the host trees (f, a, c, fq or bq)

Forest name	Pilat (P)	Bellême (B)	Orry (O)
Altitude (above sea level)	1000 m	130 m	40 m
Geographical position	45°21'N, 4°29'E	48°23'N, 0°31'E	49°07'N, 2°28'E
<i>Fagus sylvatica</i> stands (f)	Pf	Bf	Of
No. of fruitbodies	61	30	44
Area size (m ²)	240	600	400
Minimum age of the trees (years)	150	170	150
Origin of the trees	NR	NR	NR
<i>Abies alba</i> stands (a)	Pa	Ba	Oa
No. of fruitbodies	43	68	5
Area size (m ²)	200	1000	200
Minimum age of the trees (years)	80	55	30
Origin of the trees	NR	NR	P
<i>Castanea europaea</i> stands (c)	Pc	Bc	Oc
No. of fruitbodies	46	44	47
Area size (m ²)	300	200	200
Minimum age of the trees (years)	50	50	100
Origin of the trees	NR	NR	NR
<i>Fagus sylvatica</i> + <i>Quercus robur</i> stands (fq)	Not found	Bfq	Ofq
No. of fruitbodies		32	8
Area size (m ²)		600	50
Minimum age of the trees (years)		50	150
Origin of the trees		NR	NR
<i>Carpinus betulus</i> + <i>Quercus robur</i> stands (bq)	Not found	Bbq	Obq
No. of fruitbodies		46	36
Area size (m ²)		2000	2025
Minimum age of the trees (years)		15	50
Origin of the trees		NR	NR

*Stands are naturally regenerated, with local trees (NR), or planted (P) with trees from nurseries.

For genotyping, microsatellite loci and the polymorphic IGS1 fragment were amplified using the PCR Multiplex kit (QIAGEN) protocol. Reactions were performed on a PTC-100 programmable Thermo Controller (MJ Research) under the following thermoprofile: initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 90 s and extension at 72 °C for 60 s, with a final extension at 60 °C for 30 s. Forward primers were labelled with different fluorochromes. Detection of labelled PCR products was carried out on an ABI PRISM 3130 XL Genetic analyser (Applied Biosystems). For this, a 3-µL aliquot from a 1:1000 dilution of the PCR mixture was pooled with 15 µL of Hi-Di formamide and 0.2 µL of standard Genescan 500 ROX size ladder (Applied Biosystems). Fragment sizes were analysed with GENE-MAPPER 3.7 (Applied Biosystems), using default parameters for microsatellite analysis.

Mitochondrial genotyping

Polymorphism of the large subunit of mitochondrial ribosomal DNA (LrDNA) was preliminarily investigated

by sequencing amplicons from primers ML5 and ML6 (as in Selosse *et al.* 1998) on the 45 *L. amethystina* samples previously selected. The PCR thermoprofile included: initial denaturation at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 30 s. Two polymorphic sites were detected, namely at positions 60 (C or A) and 120 (T or G) downstream of the 5' end of ML5 (Fig. S1b). Only three haplotypes were recovered: C₆₀T₁₂₀ (haplotype α; GenBank Accession no. EF444506), A₆₀G₁₂₀ (haplotype β; GenBank Accession no. EF444507) and A₆₀T₁₂₀ (haplotype γ; GenBank Accession no. EF444508). The primer AML5.5 (5'-TATAAGCTAATTTATTTATATTC-3') was designed to detect haplotype α when paired with ML5.5 (5'-AAACACAGTGGCAATATTCAAT-3'), since its 3' end matches the specific C₆₀ base of this haplotype. The primer AML5 (5'-TGTGTCACCGTTATAAGTTC-3') detected haplotype β when paired with ML5, since its 3' end matches the specific base (G₁₂₀) of this haplotype (see Fig. S1b for primer positions; PCR conditions as above, except for annealing temperature: 56 °C). The haplotype was considered

Table 2 Nuclear markers (microsatellites, IGS and DALPs) and related primers used in this study

Marker		Primers sequence (5'–3')	Tm (°C)	Fragment size (bp)	Allele no.	Reference
Microsatellite	La171*	CGCTCAAACTGCACCAAC TGTTCCCTAATCAACATACCC	56	263–297	12	This study
	La115†	GCAGGAGAGTGAACCATGTG ACCCCAAATCAAAGCATTTC	60	123–140	11	This study
	La03	GAGAAAAATTTGGTGAAACCCA CAACTATGACATGCCAATTTCG	56	150–157	6	Wadud <i>et al.</i> 2006
	La17	GCTGGGTCTCTCTTCTTAATC GGAGTTGCGAAAGAGACATAG	56	119–137	7	Wadud <i>et al.</i> 2006
	La23	GCCATCGTCGGATCAGCTTAC AGATTGAGAAGATGTACGAG	56	227–239	6	Wadud <i>et al.</i> 2006
	LBTC38	CGCACGAGTCTGATAACGAG TTCCGTCACCGTAGTCACAG	56	116–130	7	Jany <i>et al.</i> 2006
	La06	GAATCACAAACCCACAGAATC CTTTTCGTCGACCCGAATTATG	56	183–186	2	Wadud <i>et al.</i> 2006
	La21	CTGGCTGTTTCGCTGTATAGT GAAGTAGATGTCACTGGATG	56	152–155	2	Wadud <i>et al.</i> 2006
Nuclear rDNA	IGS‡	IGA: CATTTTGACTTGCSATTGAGG 5SA: CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	55	237–309	9	This study
DALPs§	232	GTTTTCCTCAGTCACGACGAC	50	100–500	12	Desmarais <i>et al.</i> 1998
	233	GTTTTCCTCAGTCACGACGACG	50	100–500	21	Desmarais <i>et al.</i> 1998
	235	GTTTTCCTCAGTCACGACACAC	50	100–500	11	Desmarais <i>et al.</i> 1998

Tm, annealing temperature. *repeated motif: (GAG)₇ ... (GAG)₃ (TG)₃.

†repeated motif: (CAA)₃(CA)₇(CT)₃(CAA)₄.

‡see Fig. S1a for primer position.

§reverse primer is 5'-TTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3' for all DALPs (Desmarais *et al.* 1998).

to be γ whenever no amplicon was amplified using AML5 + ML5 and AML5.5 + ML5.5, although a PCR product was obtained using the ML5 + ML5.5 primer set (positive PCR control; all PCRs were repeated twice). This primer design allowed congruent identification of the LrDNA haplotype on the 45 preliminary samples. PCR products were checked on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ μ L).

DALP genotyping

Direct amplification of length polymorphism (DALP), a method providing polymorphic, dominant fingerprints (Desmarais *et al.* 1998), was used with three different primers (DALP232, DALP233 and DALP235) that revealed polymorphisms in preliminary tests on the 45 *L. amethystina* samples previously selected (not shown). A subsample combining half of each population and all individuals from populations Oa and Ofq (370 individuals in all) was used for DALP genotyping. Reproducibility of DALP fingerprints was tested by replicating DNA extractions on all individuals. Dye-labelled primers were used to allow detection. Amplifications were performed separately for each primer, according to conditions of Desmarais *et al.* (1998). Amplicons were pooled per indi-

vidual for electrophoresis separation on an ABI PRISM 3130 XL Genetic analyser as described for microsatellites. For each PCR, a control with sterile water instead of DNA was performed. DALP fingerprints were analysed with GENEMAPPER 3.7 (Applied Biosystems), using AFLP analysis method with default parameters. We excluded fragments that were nonfully reproducible or shorter than 100 bp, and all fingerprints were checked by eye twice. Due to possible variations of migration time on ABI PRISM, fragments differing by ± 1 bp were considered identical.

Data analysis

Populations Oa and Ofq were retrieved from the analyses (except for DALPs) because of their small sizes. In order to calculate the allelic frequencies, departure from Hardy–Weinberg equilibrium (Table 3), and linkage between loci, we used GENEPOP'007 (Rousset 2008). A correspondence factorial analysis on populations using microsatellite data was performed with GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.* 1996–2004) to detect any Wahlund effect. Population differentiation pairwise tests, Wright indices (F_{IS} , F_{ST} and F_{IT}) and Slatkin's indices (R_{ST}) were estimated using GENEPOP'007. Correlation between genetic distances (F_{ST} or R_{ST}) and geographical distances in an island model was

Table 3 Summary of population analysis by the five polymorphic microsatellite loci, the IGS and the mitochondrial LrDNA. F_{IS} were calculated using clone-corrected data (fruitbodies from the same population having identical genotypes were taken into account only once). Level of statistical support: * $P < 0.1$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. The selfing coefficient s was calculated as $s = 2F_{IS}/(1 + F_{IS})$, from clone-corrected data, excluding La171 and La115 that have null alleles

Population	Identical fruitbodies†	La171	La115	La17	La23	L 03	All micr.	IGS	Selfing coefficient s	LrDNA haplotypes ($\alpha/\beta/\gamma$) in %
Bc	2 × [2]	0.17*	0.08	0.38***	-0.07	1.00**	0.12	-0.02	0.32	52/33/14
Bbq	3 × [2]	0.4***	0.27*	0.49**	0.05	0.13*	0.27	0.04*	0.48	42/41/17‡
Bf	2 × [2]	0.29**	0.63***	0.34	0.17	-0.04	0.21	-0.10	0.40	41/36/23
Bfq	[2]	0.29**	0.88***	0.32***	0.13	0.29	0.26	-0.06	0.41	48/32/19
Ba	[3] + 6 × [2]	0.36***	0.52***	0.23***	0.29	0.87**	0.36	0.11*	0.59	59/3/11‡
Oc	[3] + [4] + [17]	0.27**	0.13*	0.23**	-0.11	1.00**	0.06	-0.03	0.35	46/34/20‡
Obq	[2]	0.43***	0.74***	0.65***	0.09	0.66*	0.38	0.02	0.60	53/34/13
Of	[2]	0.43***	0.29*	0.19**	-0.17	-0.01	0.17	0.10	0.27	49/31/21
Pc	[2]	0.55***	0.46***	0.31*	-0.06	-0.27*	0.16	0.02*	0.27	43/39/18
Pf	None	0.41***	0.27***	0.25**	0.03	0.17*	0.23	0.15***	0.38	49/36/15
Pa	5 × [2] + 2 × [4]	0.20**	0.20*	0.48*	-0.04	0.29	0.09	-0.09	0.33	54/22/24
All pop.		0.36	0.38	0.35	0.30	0.35	0.27	0.02	0.27	50/33/17

†identical fruitbodies are fruitbodies from a population sharing identical microsatellite and IGS polymorphism. In the table, numbers of identical fruitbodies are inside brackets (preceded by number of groups with the same number of fruitbodies).

‡heterozygous individual with α and γ were detected in these populations (one each in Bfq and Oc, and two in Bbq).

calculated by a Mantel test implemented in GENEPop'007. Analysis of molecular variance (AMOVA) was performed on microsatellite markers, IGS and DALP data set, using ARLEQUIN 2.0 (Excoffier *et al.* 2000), in order to test whether the genetic variation was better explained by the geographical distance or by the host tree. To visualize the genetic structure obtained with DALP, we calculated Dice distances between individual DALP profiles with DARWIN 4.0.212 (Perrier *et al.* 2003). The Dice dissimilarity, D , between two DALP profiles is calculated as $D = (b + c)/(2a + b + c)$, where a is the number of common bands, b the number of specific bands of the first individual and c the number of specific bands of the second one. Then, the neighbour-joining method (Saitou & Nei 1987) was used to build trees from Dice distance matrix, and TREEDYN (Chevenet *et al.* 2006) was used to develop a graphic display.

Results

Microsatellite and IGS polymorphism

In the 11 populations under study (497 fruitbodies), the eight microsatellite loci showed two to 12 alleles per locus (Table 2). IGS was also polymorphic, with nine alleles among which two had high frequencies (0.47 and 0.38). Based on these nine loci, 28 genotypes were found in more than one fruitbody (Table 3). These genotypes occurred in two to four fruitbodies in all case, but one: 17 fruitbodies of population Oc were identical. In three occurrences only, these fruitbodies were from separate populations.

Given allelic frequencies (not shown), and assuming genetic independence between markers, the expected likelihood of these genotypes ranged from $P = 0.031$ to $P = 0.011$ (0.0052 for the 17 Oc fruitbodies) when all fruitbodies were from the same population, and lower (from 2.2×10^{-5} to 7.5×10^{-5}) when fruitbodies occurred in different populations. Although such resemblances might occur by chance, mainly within populations, we cannot rule out that some fruitbodies represent the same genet. We used two different data sets in further analyses: one incorporating all fruitbodies (raw data) and the second excluding genotypes repeated within a population to correct for potential clones.

For La171, La115 and LBTC38, failure to obtain PCR products on some individuals suggested the occurrence of null alleles (respective estimated frequencies: 0.05, 0.03, 0.6). Null allele frequencies were higher in all populations for LBTC38 than for other markers, perhaps because it was initially designed for *Laccaria bicolor*. For La06 and La21, one of their two alleles (Table 2) was very rare. La06, La21 and LBTC38 were thus discarded from the analysis. The only linkage disequilibrium was found between La23 and La17 ($P < 0.001$ using the clone-corrected data set) and only four private alleles were detected (two in Bfq and one in Pf and Bbq; one fruitbody only in each case).

Population analyses using microsatellite and IGS loci

Whenever significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium were observed, each of the five microsatellite

Table 4 F_{ST} values for the five polymorphic microsatellite loci plus the IGS among the 11 *Laccaria amethystina* populations under study (in bold, F_{ST} significant at $P < 0.01$; boxed F_{ST} values are these of population pairs growing under the same host species). F_{ST} in the upper triangle are calculated using all fruitbodies, and F_{ST} in the lower triangle are calculated with clone corrected data

	Bc	Bbq	Bf	Bfq	Ba	Oc	Obq	Of	Pc	Pf	Pa
Bc		0.010	0.246	−0.004	0.078	0.075	0.005	0.019	0.032	0.008	0.019
Bbq	0.009		0.206	−0.0002	0.059	0.057	0.006	0.018	0.037	0.018	0.006
Bf	0.243	0.203		0.202	0.060	0.259	0.235	0.236	0.139	0.206	0.215
Bfq	−0.005	−0.001	0.199		0.044	0.059	−0.002	0.016	0.027	0.013	0.015
Ba	0.073	0.054	0.059	0.041		0.118	0.077	0.084	0.035	0.072	0.076
Oc	0.021	0.004	0.215	0.009	0.068		0.044	0.055	0.104	0.080	0.067
Obq	0.005	0.005	0.232	−0.004	0.073	0.001		0.023	0.046	0.029	0.022
Of	0.021	0.018	0.237	0.014	0.083	0.009	0.023		0.028	0.015	0.008
Pc	0.031	0.035	0.138	0.024	0.031	0.044	0.043	0.029		0.011	0.023
Pf	0.007	0.017	0.204	0.018	0.066	0.026	0.026	0.018	0.011		0.005
Pa	0.014	0.006	0.210	0.011	0.066	0.004	0.015	0.004	0.015	−0.0002	

loci showed significant heterozygote deficiencies (Table 3) in all populations, except La03 in population Pc that had significant heterozygote excess. (The too-small Oa and Ofq populations were discarded from the analysis.) Using clone correction or raw data did not modify these results (not shown), and the whole 497 fruitbody pool also showed heterozygote deficiencies (Table 3). The IGS locus exhibited heterozygote deficiencies in five populations (four were significant, both on raw and corrected data), and nonsignificant heterozygote excess in the seven other (significant in Pa on raw data only; Table 3). Heterozygote deficiencies could be explained by a Wahlund effect, but a correspondence factorial analysis failed to split the samples into distinct populations (the three first axes explained only 15% of the variability; Fig. S2, Supplementary material). Thus, genetically divergent subpopulations were unlikely to have been sampled within each of our populations. Similarly, null alleles could lead to overestimation of the homozygosity level, but markers that lack detectable null alleles had positive F_{IS} values (Table 3). Assuming that autogamy accounts for heterozygote deficiencies, and omitting La171 and La115 whose null alleles would bias the values, selfing coefficients ranged from 0.09 to 0.55 among populations (0.35 for the whole 497 fruitbodies) on raw data, and from 0.27 to 0.60 (Table 3) after clone correction.

Pairwise population differentiation tests supported the hypothesis that all populations differed significantly (not shown). Most F_{ST} values between populations were positive, but low and not significant, except for populations Bf, Ba and Oc whose F_{ST} were both high and significantly supported (Table 4). These results were not modified by taking null alleles into account or by ignoring loci with null alleles (not shown), nor after clone correction (except for significance of F_{ST} for Oc, Table 4). However, a Mantel test revealed no significant differentiation among populations

by distance ($R^2 = 0.0147$, $P = 0.63$, Fig. S3, Supplementary material). Moreover, an average of 11.4 migrants per population was calculated, i.e. about 29% of each population. F_{ST} values of population pairs growing under the same host species were low (ranging from 0.0045 to 0.23; F_{ST} value boxed in Table 4), and mean F_{ST} of such pairs (0.08) was slightly higher than the mean value of random population pairs (0.05). As these F_{ST} values were low, we pooled individuals growing in the same forest: F_{ST} among forests ranged from 0.0181 to 0.0293 (all nonsignificant, Fig. 1a). Similarly, we pooled populations growing under the same host: F_{ST} ranged from 0.0001 to 0.0299 (all nonsignificant; Fig. 1b). F_{ST} between different hosts were lower than F_{ST} between regions (Fig. 1): although this difference was not significant ($P = 0.11$ according to Mann–Whitney test), this supported the hypothesis that host species did not drive population differentiation more than distance. All these analyses gave identical trends using R_{ST} values (not shown), but the sequence of some markers (IGS, La115 and La171, Table 2) did not fit with the theoretical criteria for applying R_{ST} calculations.

Furthermore, 0.01% of the variance in an AMOVA was explained by the forest (i.e. the geographical origin), whereas only −0.04% of it was explained by the host species (Table 5). Moreover, genetic variance among populations within a forest was lower (0.09%) than that among populations growing under the same host species (0.13%; Table 5). Thus, groups of populations were more diverse when grouped by host-species than when grouped by forest, and no clear differentiation was explained by host species.

Population analysis by mitochondrial *LrDNA* polymorphism

The three mitochondrial haplotypes occurred in each population (Table 3). Four individuals cumulated α and γ

Populations pooled by:		Microsatellite + IGS	DALP
Forest	Among forests	0.01%	0.02%
	Among populations within forests	0.09%	0.19%
	Within populations	1.59%	2.12%
Host tree	Among host pool	-0.04%	0.01%
	Among populations within host pool	0.13%	0.19%
	Within populations	1.59%	2.12%
Both	Total	1.68%	2.32%
	Mean F_{ST} over all loci	0.06%	0.08%

Table 5 Distribution of microsatellites and IGS alleles or DALP fingerprints covariance, according to an AMOVA, within and between groups of populations pooled either by forests (= geographical origin) or by host trees

types (Table 3): repetition of DNA extraction and LrDNA sequencing showed that they were heteroplasmic at position 60 (not shown). In all populations, the α haplotype was the most frequent (0.59), while γ was the rarest (0.11). Among the 28 groups of fruitbodies having identical microsatellite and IGS genotype, seven exhibited two different mitochondrial haplotypes, depending on the fruitbody, and three exhibited three different haplotypes, suggesting that these fruitbodies were not necessarily from the same genet. The frequencies of the three types did not differ significantly among populations ($\chi^2 = 23.658$, d.f. = 20, $P = 0.258$) and among the three forests ($\chi^2 = 0.179$, d.f. = 4, $P = 0.996$). The haplotype frequencies obtained by pooling fruitbodies from the same host species did not differ among the different hosts ($\chi^2 = 4.136$, d.f. = 8, $P = 0.845$).

Population analysis by DALP markers

DALP patterns were highly polymorphic and, from the 370 investigated individuals, 44 fragments were reproducible and informative (i.e. present on more than one individual). Based on frequencies of DALP fragments, expected likelihood of DALP fingerprints ranged from 0.01 to 0.14. Twenty groups of fruitbodies with identical microsatellite and IGS genotype (Table 3) could be distinguished by DALPs, showing the fruitbodies were unlikely to belong to the same clone. However, in the eight remaining groups of fruitbodies, no difference in DALP fingerprint was seen [e.g. among the 17 fruitbodies from population Oc previously mentioned (Table 3; see star on Fig. 2)]. High genetic similarity or clonality might thus explain these cases.

In a phylogram recapitulation (Fig. 2), other *Laccaria* species used as outgroups clustered together and no major geographical clustering within *L. amethystina* was revealed. Some fruitbodies from the same forest or the same host tree species clustered together (Fig. 2). However, 84% of fruitbodies found under the same host tree that clustered in this analysis were also from the same population, so that clustering by geographical origin was the likely reason

for under-dispersed fruitbodies. According to an AMOVA, 0.02% of the variance of DALP fingerprints was explained by the forest (= geographical origin), while 0.01% was explained by the host species (Table 5). Both genetic variances among populations within a forest and among populations growing under the same host species were low (Table 5). Congruently with microsatellite data, the host species factor is thus less explanatory than the geographical one.

Discussion

Based on three polymorphic marker sets (five microsatellite loci plus the IGS, a mitochondrial gene, and DALP fingerprints), *Laccaria amethystina* populations showed little structure over c. 500 km (Fig. 1). Host tree species did not detectably contribute to population genetic structure (Table 5), thus making *L. amethystina* a true multihost biological species. This is, to our knowledge, the first demonstration of a multihost ability in ECM fungi by population analysis, although it is likely to be valid in many species. We also report on the reproductive biology of this species (i.e. a trend toward heterozygote deficiency and indirect evidence for biparental mitochondrial inheritance). DALP fingerprints, used here for the first time on a fungal model, produced easy and fast polymorphic patterns of dominant markers. Interestingly, AMOVA on DALPs and microsatellites were congruent (Table 5). In this species for which suitable microsatellites are difficult to find, DALPs provided useful additional tools to distinguish genets.

Cumulating all markers, the probability of encountering a genotype by chance ranged from 1.16×10^{-13} to 5.02×10^{-3} , well within the range of other studies (e.g. Kretzer *et al.* 2005; Bergemann *et al.* 2006; Lian *et al.* 2006). In all, 34 genotypes were found in more than one fruitbody. To avoid repetitive sampling of the same genet, fruitbodies were collected at more than 1.5 m from each other, i.e. more than the average genet diameter previously reported (Gherbi *et al.* 1999; Fiore-Donno & Martin 2001). The finding of identical fruitbodies could result from infrequent large clones, or

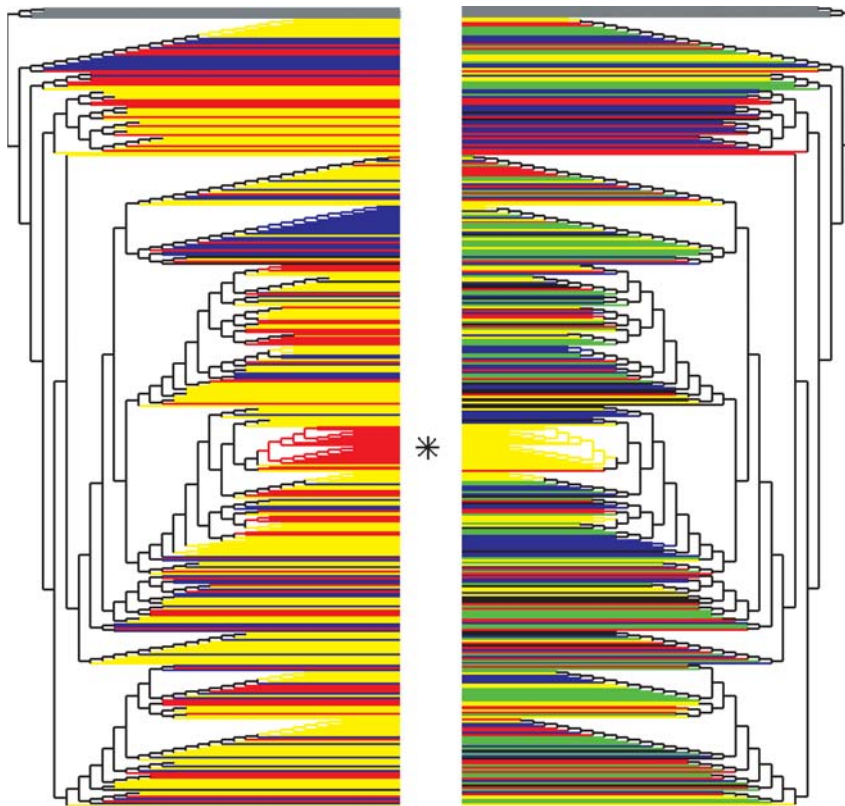


Fig. 2 NJ phylogram using Dice distances based on DALP data (grey branches: *Laccaria* spp. outgroups). The phylogram is represented twice to show congruence between geographical and host clusters: on the left, branches are coloured by forest (yellow, Bellême forest; red, Orry forest; blue, Pilat forest); on the right, colours represent host trees (yellow, *Castanea europea*; red, *Quercus robur* + *Carpinus betulus*; green, *Fagus sylvatica*; black, *Fagus sylvatica* + *Quercus robur*; blue, *Abies alba*). The star indicates the large cluster of 17 fruitbodies from Oc population (see text).

from an underestimation of genet size in previous studies, because the RAPD markers used were sensitive to contaminants. Genetically similar genets could also occur in close vicinity. Interestingly, the 17 fruitbodies from population Oc (Table 3; star on Fig. 2) with identical DALP, IGS and microsatellite fingerprints, showed three different LrDNA haplotypes, suggesting that they arose from different haploid parents (see below). Moreover, for this cluster, the probability of occurrence by chance (2.65×10^{-3}) is much lower than the observed frequency (0.38), further supporting genetic relatedness. However, since clone correction did not change our results, the exact status of these fruitbodies did not influence our conclusions.

Mating system in L. amethystina

The mitochondrial LrDNA markers showed (i) the existence of rare heteroplasmic $\alpha + \gamma$ individuals ($\alpha + \beta$ and $\beta + \gamma$ were not detectable in our design), and (ii) the absence of the fourth possible haplotype, namely $C_{60}G_{120}$ (detectable in our design). Heteroplasmy arose either by mutation in a α - or γ -only background, or after biparental inheritance. Although mitochondrial inheritance is variable in fungi (Xu *et al.* 2005), symmetrical cytoplasm mixing during mating allows biparental inheritance in basidiomycetes. In the related *Laccaria bicolor*, a low frequency of heteroplasmy

was reported when crossing haploids with divergent LrDNAs (Selosse *et al.* 1998), while most siblings were homoplasmic, probably as a result of mitochondrial sorting during zygotic growth. The frequency of $\alpha + \gamma$ heteroplasmic genets (0.006) is far lower than expected under random mating (0.057): under the assumption of biparental inheritance, mitochondrial sorting and/or a trend to inbreeding (Table 3) could explain this. The haplotype $C_{60}G_{120}$ could be absent because of (i) a lack of recombination between haplotypes α and β , and/or (ii) a counter-selection of this sequence for proper ribosomal functioning, whenever mutation or recombination produce it. The later possibility is a limitation encountered when using sequences under selection; however, since this selection is unlikely to depend on host trees, it does not modify our conclusions on nonspecificity of *L. amethystina*.

Nuclear markers showed a trend to heterozygote deficiencies in all investigated populations (Table 3). This was neither explained by fruitbodies with identical genotype (clone correction did not modify the results), nor by null alleles, since microsatellites without detectable null alleles also had positive F_{IS} (Table 3). It could result from sibling mating and selfing, due to the heavy self-spore rain under fruitbodies on existing genets. Although two mating-type loci exist in *Laccaria* spp. (Kropp & Mueller 1999), each haploid can mate with 25% of the other haploids arising

from the same dikaryon (Moore & Novak Fraser 2002). In addition, a dikaryon can provide a compatible haploid nucleus to 50% of its haploid progeny: the so-called 'Buller phenomenon' is described *in vitro* for *L. bicolor* (de la Bastide *et al.* 1995) and *in situ* for saprobic basidiomycetes (Johannesson & Stenlid 2004). Thus, inbreeding could lead to an increased homozygosity, and perhaps clumps of genetically related fruitbodies, as previously discussed. A positive relation between genetic similarity and distance at metric scale was already reported for several ECM fungi (Zhou *et al.* 2001; Liang *et al.* 2004, 2005; Dunham *et al.* 2006); Gryta *et al.* (2000) described large *Hebeloma cylindrosporum* genets with highly related individuals in their neighbourhood. Analysis of repartition of related *L. amethystina* fruitbodies would further support this explanation, but our sampling design does not allow such fine-scale spatial analysis.

In previous analyses of *L. amethystina* IGS polymorphism, there was some discrepancy as to whether heterozygotes were in excess (Gherbi *et al.* 1999) or in small deficit (Fiore-Donno & Martin 2001) for this locus. First, the highly sensible allele detection by heteroduplex formation used by Gherbi *et al.* (1999) likely revealed more alleles and heterozygotes that went undetected in the study by Fiore-Donno & Martin (2001). Second, under the previous assumption of a fine-scale structure, plots of the latter study (5 × 10 m) were smaller than those of Gherbi *et al.* (1999; 10 × 10 m) and might be more impacted by local inbreeding as described above. Third, in our study, IGS are closer to Hardy-Weinberg equilibrium than are microsatellite loci (Table 3). IGS might be genetically linked to a mating-type locus, and thus driven to higher heterozygosity levels. Selosse *et al.* (1996) demonstrated that 6.5% of haploids in *L. bicolor* inherit IGS copies from both parents, due to a crossing over within the rDNA locus: the occurrence of such haploids in *L. amethystina* populations could increase the apparent heterozygosity level. Last, as for LrDNA, selective pressures might bias this marker. This could also account for (i) the high frequency of two alleles in this and other works (Gherbi *et al.* 1999; Fiore-Donno & Martin 2001), and (ii) the conserved sequence found within the IGS (see Fig. S1a).

Spatial population genetic structure in *L. amethystina*

In current studies, ECM fungal population structures range between two extreme types. ECM species with low dispersion, and thus high structure over short (kilometric-scale) distances, are exemplified by hypogeous species dispersed by animals (Kretzer *et al.* 2005). Due to their below-ground fruiting, these species accumulate large spore banks in soils that outcompete migrants: F_{ST} values reached 0.26 over 8.5 km for *Rhizopogon occidentalis* (Grubisha *et al.* 2007). At the opposite, spores of ECM

species with epigeous fruitbodies disperse by wind, likely over long distances. The spore bank is less important and, even if most spores land close to the parental fruitbody, long-distance gene flow is possible. As a result, differentiation over 100–1000 m scales is lacking (e.g. no detectable structure over 230–1090 m was found in *Russula brevipes*; Bergemann *et al.* 2006). There are also intermediate models such as *Suillus grevillei* ($F_{ST} = 0.020$ over 700 m; Zhou *et al.* 2001) or *Cantharellus formosus* (detectable structure at more than 400 m only; Dunham *et al.* 2006). *L. amethystina* was previously shown to exhibit very moderate structure at small scales (F_{ST} ranging up to 0.02 for IGS over 45 m; Gherbi *et al.* 1999). In our study, no structure was found over 450 km (Tables 4 and 5) and F_{ST} values did not correlate with distance (Fig. S3). This is reminiscent of wind-dispersed saprophytic and parasitic basidiomycetes (e.g. Kausserud & Schumacher 2003). The average migrant proportion (29%) relates to dikaryotic genotypes: they occurred from mating between two migrant haploid spores, whereas genotypes occurring from mating between migrant and local spores might remain undetected. Thus, the proportion of migrant spores might be as high as $0.29^{1/2} = 0.54$.

Most populations of *L. amethystina* showed nonsignificant differentiation within forests, and even among forests (Fig. 1), with the exception of three (namely two Bellême populations, Bf and Ba, and an Orry population, Oc; Table 4). Reasons for these highly differentiated populations are unclear, but at least unrelated to (i) tree age or an origin from a nursery, as these populations have different ages and are naturally regenerated (Table 1), (ii) the forest of origin, since other populations from these forests are not differentiated, or (iii) the host tree, since three different tree species are involved.

The 500-km scale was hitherto poorly investigated for ECM species. Distance of 50 km can lead to some isolation (as for *T. populinum*; Gryta *et al.* 2006) and distance over 1000 km can lead to stronger differentiations, e.g. for hypogeous species such as *Tuber melanosporum* ($F_{ST} = 0.20$ between Italy and northern Spain; Murat *et al.* 2004) or putatively asexual species such as *Cenococcum geophilum* ($F_{ST} = 0.25$ over North America; LoBuglio *et al.* 2002). Bergemann & Miller (2002) reported an $F_{ST} = 0.43$ for *Russula brevipes* over 1500 km in the western USA, but the lack of shared alleles between the populations strongly questioned their conspecificity. For *L. amethystina*, the distance at which all populations significantly differ is not reached in this study, and requires samplings at longer distances. *L. amethystina* is considered to be a Eurasiatic species (Kropp & Mueller 1999; Wadud *et al.* 2006), but the low portability of microsatellites from Japanese strains in our study suggests that some differentiation might exist over Eurasia. Interestingly, while our strains showed only one to two diverging bases in ITS sequences (GenBank

Accession nos EU076450–EU076454; M-A. Selosse and L. Vincenot, unpublished data), their consensus sequence showed 47 differences, including indels, with a Japanese *L. amethystina* ITS (AB211270). Therefore, genetic differentiation in *L. amethystina* at a continental scale remains open to investigation.

L. amethystina as a multihost species

In hyperdiverse ECM fungal communities (e.g. Kennedy *et al.* 2003; Richard *et al.* 2005; Twieg *et al.* 2007), specialization, and thus host preferences, can be expected if high competition favours resource partitioning (MacArthur & Pianka 1966). Host specificity and host jumps likely contributed to evolution of several ECM fungal taxa (Kretzer *et al.* 1996; den Bakker *et al.* 2004), in some of which morphological differences are less obvious than molecular ones (Aanen *et al.* 2000; Taylor *et al.* 2007). However, we found no evidence for host-specific CBSs within *L. amethystina*. Since populations are not strongly isolated by distance, any isolation due to host tree could be seen as an evidence for specialization. However, no such trend was observed (Fig. 2; Table 5), supporting the idea that *L. amethystina* is a true multihost species, over a host range including native trees (*Fagus sylvatica*, *Abies alba*, *Carpinus betulus* and *Quercus robur*) and the introduced chestnut tree (*Castanea europaea*). Furthermore, assignation tests performed on fruitbodies from the small populations (Oa and Ofq) failed to indicate any host-related pattern. The same result was obtained for assignation of fruitbodies from another set of 13 small French populations found under various host trees (same hosts and the more recently introduced *Pseudotsuga menziesii* and *Picea abies*, at other geographical sites; not shown). *L. amethystina* seemed a good candidate for encompassing biological species, since in the *Laccaria* genus, species delineation remains hitherto unclear, especially in Europe where the morphospecies concept mainly applies (Mueller 1992; Kropp & Mueller 1999). Other *Laccaria* spp. likely encompass unrecognized CBSs (P-A. Moreau and G. Mueller, personal communication). In addition, European *L. amethystina* are late-stage fungi (i.e. occur in old forests where host trees have modified the environment and where evidence suggests that, perhaps in adaptation to these conditions, more host-specific fungi are selected; Last *et al.* 1987; Horton *et al.* 2005).

Nevertheless, the demonstration that *L. amethystina* is largely outcrossing raises two concerns. First, allogamy might limit evolution of specificity, since random mating impedes the accumulation, at independent loci, of alleles selectively useful for interaction with a given host (recombination load). Noteworthy, the *Eucalyptus*-specific *Laccaria fraterna* species has bisporic basidia (each spore receives two compatible haploid nuclei resulting from

meiosis) and is thus autogamous (Diez 2005). There are, nevertheless, allogamous species with tetrasporic basidia (haploid spores) among host-specific ECM species, such as *Laccaria masonii*, *L. fibrillosa*, *L. lilacina* (specific to *Nothofagus* spp. in New Zealand) and *L. galerinoides* (specific to *Nothofagus* spp. in southern America; G. Mueller, personal communication). Thus, although it is worth testing whether autogamy (vs. allogamy) favours evolution of specificity, and whether autogamy is over-represented among specific ECM fungi, allogamy is not a strict barrier for evolution of specificity. A second concern is that, due to outcrossing, neutral markers could be exchanged, even under limited gene flow among partially isolated host-specific subpopulations. One might imagine that a low flow homogenizes microsatellite polymorphism (a single biological species) among populations, whereas, within population, loci involved in symbiosis undergo strong selection by their host, forming host-specific 'subspecies'. Recently, extensive gene flow in the ECM *Suillus luteus* was shown to impair genetic differentiation, based on microsatellites, of populations inhabiting polluted soils (Muller *et al.* 2007). This scenario predicts that relevant (selected) loci in *L. amethystina* would be polymorphic among populations under different hosts, but monomorphic in populations under a given host, at least if the population is sufficiently old for selection to have acted. The related *L. bicolor* is a promising model to find relevant loci, or even loci portable to *L. amethystina*, since many genes important for the ECM symbiosis are known in *L. bicolor* (Kropp & Mueller 1999) and since its genome is fully sequenced (Martin *et al.* 2008).

For ECM fungi, the costs of being generalist (such as underperforming with each host as compared to specific species; Kawecki 1994) might be counterbalanced by spatial and temporal heterogeneity of host communities in temperate forests. First, unmanaged temperate forests contain multiple species that are heterogeneously distributed and thus spatially diverse (Brokaw & Busing 2000; McCarthy 2001). Below ground, even stronger heterogeneity is expected at the root level, so that at the mycelial scale, generalist species might colonize roots and survive better than specific ones. Such a heterogeneous host environment is very different from that of parasites that live mostly or exclusively inside their hosts; this might limit the trend to host specialization among mycorrhizal fungi. Interestingly, the monospecific stands sampled in this study resulted from forest management. Second, temporal variations also occur in the composition of tree communities, e.g. after gap formation (McCarthy 2001) or during ecological succession (e.g. Richard *et al.* 2005). Generalist fungi may thus survive better over long periods in these cases. More generally, extant forest management practices favouring monospecific, undisturbed stands might favour specific ECM species; this could drive some

host specialization over a few generations, as recently described for parasitic mites forced to live on different hosts (Magalhaes *et al.* 2007). Then, secondary genetic isolation might be selected to avoid mixing of traits linked to specificity (Kohn 2005). Evolution of ECM specificity in managed forests therefore deserves further attention.

Outlook: networks?

Gene flow in field populations provided evidence that an ECM species can be truly multihost *in situ*. This result supports the common view that ectomycorrhizal fungi are not host-specific and adds to the growing genetic evidence that common mycelial networks link different plant species (Selosse *et al.* 2006). So far, genetic evidence that a given genet colonizes several trees is limited to trees from the same species (Lian *et al.* 2006). Evidence that a given ECM genet occurs on several hosts is up to now restricted to achlorophyllous species that exploit common mycelial networks to obtain carbon from surrounding plants (Taylor & Bruns 1997; Selosse *et al.* 2002). Although fungal sharing between plant species might have important consequences, the frequency of this phenomenon still awaits rigorous analysis.

Acknowledgements

The authors warmly thank Catherine Reeb, Nicolas Mathevon and his family, and the Office National des Forêts (division de Chantilly) for help during fruitbody sampling, as well as Marie-Catherine Boisselier-Dubaye, Sarah Samadi and Anne-Laure Robert for help with microsatellite design at the Muséum National d'Histoire Naturelle (Service de Systématique Moléculaire). They thank Pierre-Arthur Moreau, Greg Mueller, Franck Richard, Catherine Zabinski and three anonymous reviewers for rich discussions. They thank Simon Tillier and François Le Tacon for their support in launching this work, funded by the Institut Français de la Biodiversité ('Distribution de la biodiversité chez quatre champignons symbiotiques') and the Centre National de la Recherche Scientifique (ATIP to M-A. Selosse). Most molecular data used in this work were produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 'Montpellier Environnement Biodiversité'.

References

Aanen DK, Kuyper TW, Mes THM, Hoekstra RF (2000) The evolution of reproductive isolation in the ectomycorrhizal *Hebeloma crustuliniforme* aggregate (basidiomycetes) in Northwestern Europe: a phylogenetic approach. *Evolution*, **54**, 1192–1206.

den Bakker HC, Zuccarello GC, Kuyper TW, Noordeloos ME (2004) Evolution and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Leccinum*. *New Phytologist*, **163**, 201–215.

de la Bastide PY, Kropff BR, Piché Y (1995) Vegetative interactions among mycelia of *Laccaria bicolor* in pure culture and in symbiosis with *Pinus banksiana*. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 1768–1779.

Belkhir K *et al.* (1996) *GENETIX, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

Bergemann SE, Douhan GW, Garbelotto M, Miller SL (2006) No evidence of population structure across three isolated sub-populations of *Russula brevipes* in an oak/pine woodland. *New Phytologist*, **170**, 177–184.

Bergemann SE, Miller SL (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytologist*, **156**, 313–320.

Bever JD (2002) Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **269**, 2595–2601.

Brokaw N, Busing RT (2000) Niche versus chance and tree diversity in forest gaps. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 183–188.

Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL (2002) Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 352–359.

Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TREEDYN: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, **7**.

Desmarais E, Lanneluc I, Lagnel J (1998) Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucleic Acids Research*, **26**, 1458–1465.

Diez J (2005) Invasion biology of Australian ectomycorrhizal fungi introduced with eucalypt plantations into the Iberian Peninsula. *Biological Invasions*, **7**, 3–15.

Douhan GW, Rizzo DM (2005) Phylogenetic divergence in a local population of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum*. *New Phytologist*, **166**, 263–271.

Dunham SM, O'Dell TE, Molina R (2006) Forest stand age and the occurrence of chanterelle (*Cantharellus*) species in Oregon's central Cascade Mountains. *Mycological Research*, **110**, 1433–1440.

Excoffier L, Schneider S, Roessli D (2000) *ARLEQUIN: A Software for Population Genetics Data Analysis*, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.

Fiore-Donno A-M, Martin F (2001) Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist*, **152**, 533–542.

Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor DL (2006) Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric (*Amanita muscaria*). *Molecular Ecology*, **15**, 225–239.

Gherbi H, Delaruelle C, Selosse M-A, Martin F (1999) High diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology*, **8**, 2003–2013.

Gonthier P, Garbelotto M, Varese GC, Nicolotti G (2001) Relative abundance and potential dispersal range of intersterility groups of *Heterobasidion annosum* in pure and mixed forests. *Canadian Journal of Botany*, **79**, 1057–1065.

Grubisha LC, Bergemann SE, Bruns TD (2007) Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology*, **16**, 1811–1822.

Grünig CR, Brunner PC, Duo A, Sieber TN (2007) Suitability of methods for species recognition in the *Phialocephala fortinii*-*Acephala applanata* species complex using DNA analysis. *Fungal Genetics and Biology*, **44**, 773–788.

- Gryta H, Debaud J-C, Marmeisse R (2000) Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity*, **84**, 294–302.
- Gryta H, Carriconde F, Charcosset JY, Jargeat P, Gardes M (2006) Population dynamics of the ectomycorrhizal fungal species *Tricholoma populinum* and *Tricholoma scalpturatum* associated with black poplar under differing environmental conditions. *Environmental Microbiology*, **8**, 773–786.
- Horton TR (2002) Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil*, **244**, 29–39.
- Horton TR, Molina R, Hood K (2005) Douglas-fir ectomycorrhizae in 40- and 400-year-old stands: mycobiont availability to late successional western hemlock. *Mycorrhiza*, **15**, 393–403.
- Jany JL, Bousquet J, Gagne A, Khasa DP (2006) Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. *Mycological Research*, **110**, 51–59.
- Johannesson H, Stenlid J (2004) Nuclear reassortment between vegetative mycelia in natural populations of the basidiomycete *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 563–570.
- Kausserud H, Schumacher T (2003) Genetic structure of fennoscandian populations of the threatened wood-decay fungus *Fomitopsis rosea* (Basidiomycota). *Mycological Research*, **107**, 155–163.
- Kawecki TJ (1994) Accumulation of deleterious mutations and the evolutionary cost of being a generalist. *American Naturalist*, **144**, 833–838.
- Kennedy PG, Izzo AD, Bruns TD (2003) There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest. *Journal of Ecology*, **91**, 1071–1080.
- Kohn LM (2005) Mechanisms of fungal speciation. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 279–308.
- Kretzer A, Li YN, Szaro T, Bruns TD (1996) Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus sensu lato*: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia*, **88**, 776–785.
- Kretzer A, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2005) Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology*, **16**, 313–323.
- Kropp BR, Mueller GM (1999) *Laccaria*. In: *Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile* (eds Cairney JW, Chambers SM), pp. 65–88. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Last FT, Dighton J, Mason PA (1987) Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology & Evolution*, **2**, 157–161.
- Le Gac M, Hood ME, Fournier E, Giraud T (2007) Phylogenetic evidence of host-specific cryptic species in the anther smut fungus. *Evolution*, **61**, 15–26.
- Lian CL, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T (2006) *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytologist*, **171**, 825–836.
- Liang Y, Guo LD, Ma KP (2004) Genetic structure of a population of the ectomycorrhizal fungus *Russula vinosa* in subtropical woodlands in southwest China. *Mycorrhiza*, **14**, 235–240.
- Liang Y, Guo LD, Ma KP (2005) Population genetic structure of an ectomycorrhizal fungus *Amanita manginiana* in a subtropical forest over two years. *Mycorrhiza*, **15**, 137–142.
- LoBuglio KF, Taylor JW (2002) Recombination and genetic differentiation in the mycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* Fr. *Mycologia*, **94**, 772–780.
- MacArthur RH, Pianka ER (1966) On optimal use of a patchy environment. *American Naturalist*, **100**, 603–6.
- Magalhaes S, Fayard J, Janssen A, Carbonell D, Olivier I (2007) Adaptation in a spider mite population after long-term evolution on a single host plant. *Journal of Evolutionary Biology*, **20**, 2016–2027.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D et al. (2008) The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **452**, 88–92.
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002) Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist*, **153**, 345–357.
- McCarthy J (2001) Gap dynamics of forest trees: a review with particular attention to boreal forests. *Environmental Review*, **9**, 1–59.
- Moore D, Novak Fraser L (2002) *Essential Fungal Genetics*. Springer-Verlag, New York.
- Moreau PA, Peintner U, Gardes M (2006) Phylogeny of the ectomycorrhizal mushroom genus *Alnicola* (Basidiomycota, Cortinariaceae) based on rDNA sequences with special emphasis on host specificity and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **38**, 794–807.
- Mueller GM (1992) Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Fieldiana 30. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Muller LAH, Vangronsveld J, Colpaert JV (2007) Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and non-polluted habitats. *Molecular Ecology*, **16**, 4728–4737.
- Murat C, Diez J, Luis P et al. (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, **164**, 401–411.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data analysis methods. In: *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants* (eds Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC), pp. 43–76. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.
- Rousset F (2008) GENEPOL'007: a complete re-implementation of the GENEPOL software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Notes*, **8**, 103–106.
- Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse M-A (2005) Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist*, **166**, 1011–1023.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406–425.
- Sarthou C, Boisselier-Dubayle MC, Lambourdiere J, Samadi S (2003) Polymorphic microsatellites for the study of fragmented populations of *Pitcairnia geyskesii* L. B. Smith (Bromeliaceae), a specific saxicolous species of inselbergs in French Guiana. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 221–223.
- Selosse M-A, Costa G, Battista CD, Tacon FL, Martin F (1996) Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Current Genetics*, **30**, 332–337.
- Selosse M-A, Martin F, Tacon FL (1998) Survival of an introduced ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* strain in European forest plantation monitored by mitochondrial ribosomal DNA analysis. *New Phytologist*, **140**, 753–761.
- Selosse MA, Weiss M, Jany JL, Tillier A (2002) Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, **11**, 1831–1844.

- Selosse MA, Richard F, He XH, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution*, **21**, 621–628.
- Smith SE, Read DJ (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Taylor DL, Bruns TD (1997) Independent, specialized invasions of ectomycorrhizal mutualism by two nonphotosynthetic orchids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 4510–4515.
- Taylor AFS, Hills AE, Simonini G, Munoz JA, Eberhardt U (2007) *Xerocomus silwoodensis* sp nov., a new species within the European *X. subtomentosus* complex. *Mycological Research*, **111**, 403–408.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S *et al.* (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 21–32.
- Taylor JW, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D (2006) Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**, 1947–1963.
- Tedersoo L, Pellet P, Koljalg U, Selosse MA (2007) Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understory Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia*, **151**, 206–217.
- Twieg BD, Durall DM, Simard SW (2007) Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist*, **176**, 437–447.
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Ishida TA, Hogetsu T (2006) Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 130–132.
- Xu J, Cheng M, Tan Q, Pan Y (2005) Fungal mitochondrial inheritance. In: *Evolutionary Genetics of Fungi* (ed. Xu J), pp. 221–252. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Zhou Z, Miwa M, Hogetsu T (2001) Polymorphism of simple sequence repeats reveals gene flow within and between ectomycorrhizal *Suillus grevillei* populations. *New Phytologist*, **149**, 339–348.

This work is part of M. Roy's thesis on mycorrhizal networks that link different plant species and their role in plant physiology. M. Roy has been doing the molecular typing and genetic analyses. M. Proffit initiated the microsatellite screening during her master of science. M-P. Dubois, L. Vincenot and E. Desmarais gave help in the molecular techniques used in this study. This project was designed by M-A. Selosse, in a program on ecological role of mycorrhizal networks, and he sampled the fungal material. M-A. Selosse, L. Vincenot and M. Roy wrote the paper.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article:

Fig. S1a,b Primers designed for this study.

Fig. S2 Correspondence factorial analysis of the 497 fruitbodies based on microsatellites and IGS genotypes.

Fig. S3 Mantel test on the 11 populations under study.

This material is available as part of the online article from:
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2008.03790.x>
 (This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing are not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

III.3. Structure génétique des populations de *Laccaria amethystina* à l'échelle de leur aire de répartition

Une approche de génétique des populations permet de décrire et de comparer la structure des populations à l'aide de marqueurs génétiques neutres, mais associée à une approche phylogénétique, la description de la biogéographie est plus complète (Chapitre I). Les études phylogénétiques sont beaucoup plus courantes, à cette échelle, pour les champignons ectomycorhiziens que les approches de génétique des populations. Bien que la plupart se consacrent à la taxonomie des clades étudiés, certaines de ces études donnent accès à l'histoire des espèces et aux facteurs qui ont modelé leurs populations (Douhan *et al.*, en préparation).

Une particularité de la phylogéographie des espèces ectomycorhiziennes est le lien fort entre le champignon et ses hôtes : le maintien de la symbiose, par la migration des hôtes ou par la disponibilité de nouveaux hôtes dans un nouveau milieu, est nécessaire à la migration d'une espèce ectomycorhizienne. Par exemple, Martin *et al.* (2002), à travers une phylogénie du genre ectomycorhizien cosmopolite *Pisolithus*, ont montré que plusieurs lignées sont restreintes à des régions géographiques limitées et associées à des plantes endémiques (comme *P. aurantioscabrosus*, symbiote d'*Azelaia* en Afrique de l'Est). Plus récemment, d'autres lignées ont migré de l'Holarctique à l'Hémisphère sud avec leurs hôtes, puis se sont associées à de nouveaux hôtes régionaux, comme *P. tinctorius* introduit en Australie avec les pins, et s'associant ensuite aux eucalyptus et acacias indigènes. Ce champignon aurait ensuite été dispersé à longue distance, traversant peut-être la Tasmanie par des courants atmosphériques jusqu'à la Nouvelle-Zélande (Moyersoen *et al.* 2003). Cette migration depuis l'Australie aurait été rendue possible par la présence en Nouvelle-Zélande de kanuka (*Leptospermum ericoides*), plante à laquelle les migrants ont été capables de s'associer. Wu *et al.* (2001) se sont intéressés à biogéographie de *Suillus* sp. en Amérique du Nord et en Asie. À l'aide d'une phylogénie basée sur l'ITS, ils ont montré la proximité phylogénétique de deux espèces sœurs, *S. spraguei* (aux États-Unis) et *S. decipiens* (en Chine). Les deux espèces ont divergé d'un ancêtre commun, et *S. spraguei* est associé à *P. strobus*, tandis que *S. decipiens* s'associe à *Pinus koraiensis* et *P. armandii*, deux lignées de pins dérivées de *P. strobus*, et les auteurs suggèrent une cospéciation du champignon et de ses hôtes. L'association entre *Suillus* sp. et le genre *Pinus* sp. serait

apparue il y a 50 Ma, et les partenaires auraient pu migrer simultanément par le détroit de Bering, s'adaptant à leurs nouveaux habitats. Enfin, les truffes sont un exemple européen d'histoires conjuguées des champignons ectomycorhiziens et de leurs hôtes. Les populations de *Tuber melanosporum* et *T. magnatum*, ayant survécu au dernier âge de glace (de -10000 à -16000 ans) dans des refuges forestiers sud-européens, auraient recolonisé leur aire de répartition actuelle (France, Italie, Espagne) en même temps que leurs hôtes chênes, noisetiers et tilleuls (*Quercus* sp., *Corylus* sp., *Tilia* sp. ; Murat *et al.* 2004, Rubini *et al.* 2005).

Suite à l'étude de Roy *et al.* (2008), révélant l'absence de différenciation génétique entre des populations distantes de 450 km, nous nous sommes intéressés à la biogéographie de *L. amethystina* en Europe : nous souhaitons estimer les flux de gènes entre ses populations à l'échelle continentale, afin de préciser leur taille de voisinage génétique, de préciser les facteurs (environnement, distance) qui peuvent structurer ces populations, et potentiellement de révéler des éléments de leur histoire (goulot d'étranglement, effet de fondation, migration à longue distance...). Pour mener à bien cette étude de génétique des populations, nous avons choisi d'utiliser des marqueurs neutres, codominants et reproductibles : des microsatellites préalablement publiés pour *L. amethystina* et *L. laccata* (Wadud *et al.* 2006a, 2006b ; Roy *et al.* 2008), et d'autres que nous avons choisis sur la base du génome de *L. bicolor*, transférables à *L. amethystina*. Le locus de l'IGS1, qui présente des propriétés semblables aux microsatellites, a été utilisé également. Pour obtenir une image plus précise des relations entre les populations et estimer leurs variabilités neutre et sélectionnée, nous avons complété cette approche de génétique des populations, nous avons choisi dans le génome de *L. bicolor* des loci codants et non codants et réalisé une phylogénie de *L. amethystina* et d'autres laccaires européens. Nous avons appliqué cette approche complémentaire à 16 populations européennes, distantes au maximum de 2900 km.

D'autre part, K. Nara et son équipe de l'Université de Tokyo ont plusieurs fois décrit les populations de *L. amethystina* au Japon, pionnière sur les pentes du Mont Fuji (Nara *et al.* 2003 ; Wadud *et al.* 2006a, 2006b ; Wadud 2007 ; Ishida *et al.* 2008). Bien que la morphologie de *L. amethystina* soit semblable sur toute son aire de répartition (de l'ouest de l'Europe à l'Est de l'Asie), l'écologie de ses populations semble variable, et des variations moléculaires existent. Nous avons donc comparé la variabilité génétique des populations européennes de *L. amethystina* avec une population japonaise du Mont Fuji, échantillonnée par K. Nara.

L'article ***'Wide-scale population genetics of the ectomycorrhizal Basidiomycete Laccaria amethystina reveal extensive gene flow over Europe and putative speciation over Eurasia'***, co-écrit par Lucie Vincenot, Christopher Sthultz, Jessy Labbé, Marie-Pierre Dubois, Kazuhide Nara, Francis Martin et Marc-André Selosse s'intéresse donc à la structure génétique spatiale, en Europe et entre l'Europe et le Japon, des populations de *L. amethystina*. Cette espèce transcontinentale représentait un modèle biologique approprié pour s'intéresser à la biogéographie d'une espèce ectomycorhizienne, à des échelles jusque-là non encore étudiées.

Seize populations de *L. amethystina* de 12 pays européens (de l'Espagne à la Finlande) ont été aimablement collectées par différents échantillonneurs ; une population japonaise collectée par K. Nara est venue s'y ajouter, représentant l'extrême Est de l'aire de répartition de l'espèce. Ces populations ont été génotypées à l'aide de marqueurs neutres, préalablement publiés ou développés sur la base de la séquence génomique de *L. bicolor*. Parallèlement, une phylogéographie de *L. amethystina* en Europe et au Japon a été réalisée sur la base des séquences de 5 loci nucléaires ou mitochondriaux, codants ou non codants.

Notre étude montre en premier lieu des flux géniques forts et multidirectionnels entre les populations européennes, limitant leur différenciation génétique (F_{ST} global : 0,134). Cette absence de structure géographique, apparaissant aussi par la phylogénie, est confirmée par un test de Mantel, montrant une absence d'isolement par la distance sur 2900 km ($r=0,098$, $p=0,056$). Ce résultat suggère l'existence d'une population européenne panmictique de *L. amethystina*, maintenue par une dispersion des spores à très longue distance, probablement par les courants atmosphériques. L'efficacité de la dispersion des spores pourrait être autorisée par l'absence de barrière géographique majeure dans l'Ouest de l'Europe et les capacités adaptatives de l'espèce à des milieux forestiers variables.

Entre l'ensemble des populations européennes et la population japonaise apparaît en revanche une très forte différenciation génétique ($F_{ST}=0,434$), suggérant l'existence d'une spéciation cryptique chez *L. amethystina* en Eurasie. Les phylogénies soutiennent cette hypothèse, mais le mécanisme de différenciation entre les populations reste pour le moment inconnu. Des échantillonnages intermédiaires seront nécessaires pour explorer les facteurs de spéciation et la répartition géographique de chacune des espèces.

Wide-scale population genetics of the ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina* reveal extensive gene flow over Europe and putative speciation over Eurasia.

LUCIE VINCENOT¹, CHRISTOPHER STHULTZ¹, JESSY LABBÉ², MARIE-PIERRE DUBOIS¹, KAZUhide NARA³, FRANCIS MARTIN² and MARC-ANDRÉ SELOSSE¹

1: UMR5175, CEFÉ/CNRS Team Biotic Interactions, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France

2: UMR1136, INRA-Nancy Université, Interactions Arbres/Microorganismes, INRA-Nancy, 54280 Champenoux, France

3: Asian Natural Environmental Science Center, The University of Tokyo, Midori-cho 1-1-8, Nishi-Tokyo, Tokyo 188-0002, Japan

Keywords: ectomycorrhizae, isolation by distance, cryptic speciation, phylogeography

Corresponding author: Lucie Vincenot, CEFÉ-CNRS, 1919 route de Mende 34293 Montpellier France, fax: 33 4 67 41 21 38 (lucie.vincenot@cefe.cnrs.fr)

Running title: population genetics of *Laccaria amethystina*

Abstract

Actual biogeographic patterns and distribution of cosmopolitan fungal species, despite their ecological and economic importance, remain very poorly understood. Coupling population genetics and phylogenetic molecular approaches could help to better describe spatial geographic structure of populations, especially at very large continental or intercontinental scales. Using 9 neutral markers for population genetics, either previously published or designed for this study, we characterized gene flows among 16 populations of the model ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina* at the European scale (2900km). We then widened our scope to a population from Japan, allowing us to compare it to European populations through population genetics and multigene phylogenies. Our results show the absence of biogeographic pattern in European populations of *L. amethystina*, with limited differentiation among populations (global $F_{ST}=0.041$) and no isolation by distance ($P=0.056$) through this area. This global panmictic European pattern may be possible because of LDD of spores of *L. amethystina*, relayed by its adaptability to the variety of European forest habitats. The Japanese population appeared strongly differentiated from the European cluster ($F_{ST}=0.434$), with a very strong correlation between genetic and geographic distances over 10000km ($P=0.004$) raising the question of speciation. Our multi-gene phylogenetic approach confirmed the homogeneity of European populations, and their strongly supported divergence from the Japanese *L. amethystina*. Coupling population genetics and phylogenetics, we revealed a putative allopatric speciation event within the *L. amethystina* species in Eurasia.

Introduction

Many fungal species have a broad repartition area extending to a whole continent, or even over several continents, and hence apparently follow the classic Beijerinckian paradigm that for microbes, “everything is everywhere, the environment selects” (O’Malley 2007). Indeed, high dispersion abilities by spores could allow extensive flow of propagules at intra- and inter-continental distances, and 28 to 63% of macrofungal species names are shared by at least two continental regions (Mueller *et al.* 2007). But the extent to which these names apply to the same biological species (i.e. groups of interbreeding natural populations) remains questionable, and detailed genetic analyses often challenge global species, suggesting that biological species are sometimes overlooked due to the limited morphological characters available for fungi (Taylor *et al.* 2006). By assessing gene flows and comparing populations on more diverse criteria than morphology only, population genetics can help delineating biological species. However, facing the extraordinary diversity of fungal species, population genetics studies remain limited for fungi as compared to other living organisms (to our records in ISI Web of Knowledge, 49 papers for fungi, against 106 for animals and 226 for plants dealt in 2008 with ‘population genetics’ or ‘gene flow’). Since few of these studies are designed at global scale, mycologists recently called for more studies on population genetics and biogeography at large scale (e.g. Taylor *et al.* 2006; Halling *et al.* 2008), to better understand the structure, dispersion and evolutionary forces that shape fungal species.

Long-distance dispersal (LDD) is known for some phytopathogenic fungi (Brown & Hovmøller, 2002), e.g. due to recent human globalization (e.g. for *Phytophthora infestans*, Goodwin *et al.* 1994) or by aerial dispersion, such as for rusts (Purdy *et al.* 1985). This leads to large repartition areas, as for *Mycosphaerella graminicola* in Europe (Torriani *et al.* 2009), *Leptosphaeria maculans*/L. *biglobosa* in America (Dilmaghani *et al.* 2009), *Melampsora larrici-populina* from Europe to Canada (Barrès *et al.* 2008), or *Phaeosporia nodorum* over the Northern Hemisphere (Stukenbrock *et al.* 2006). Among saprobic species, LDD and large repartition areas exist in the *Ganoderma applanatum*/G. *australe* complex from the Southern Hemisphere (Moncalvo & Buchanan, 2008), *Schizophyllum commune* (James *et al.* 1999) or *Serpula lacrymans* worldwide (Kausrud *et al.* 2007; human dispersion is involved in this case). For ectomycorrhizal (EM) fungi that associate with forest trees in most temperate and tropical ecosystems and encompass economically important edible species such as *Tricholoma matsutake* or *Tuber* sp. (Smith & Read 2009), the picture remains unclear. The structure of EM populations has very often been explored at small, local scales,

focusing on genet size and diversity (e.g. Guidot *et al.* 2003, Bergemann & Miller 2002, Gherbi *et al.* 1999). Among few large-scale studies investigating gene flow, Bergemann & Miller (2002) found limited gene flow between populations of *Russula brevipes* from North American forests ($F_{ST}=0.43$ over 1500km), questioning their conspecificity; Rubini *et al.* (2005) studied populations of *Tuber magnatum* found a significant isolation by distance (IBD) over 900km, i.e. its whole geographic range; Murat *et al.* (2004) found IBD for *T. melanosporum* over 900km; finally, Xu *et al.* (2008) detected IBD over 1050km in *Tricholoma matsutake* from South-Western China. IBD were even seen at lower scales for species such as *Rhizopogon* spp. (over 5km, Kretzer *et al.* 2005) or *Cenococcum geophilum* (over 250km, Jany *et al.* 2002). Moreover, ‘population genetics’ studies sometimes revealed the existence of cryptic sibling species in sympatric context, e.g. in *Tricholoma scalpturatum* (Carriconde *et al.* 2008) or *Cantharellus formosus* (Dunham *et al.* 2003). However, most studies of EM fungal populations are restricted to a country scale and none extends over more than 1500km, to our knowledge.

At such larger scales, studies on EM fungi address a more phylogenetic / phylogeographic approach, relying on comparisons of a limited sample number at coding loci. Some taxa have potential to represent monophyletic lineages at intercontinental level (e.g. *Leccinum*, den Bakker *et al.* 2007), while more subtle relationships may exist: Wu *et al.* (2000) found that morphologically indistinguishable *Suillus spraguei* specimens from China and North America were paraphyletic. Most works suggest that some intercontinental EM species should be splitted into several units, as for non-EM species (Taylor *et al.* 2006): the putatively ‘panglobal’ *Pisolithus tinctorius* was splitted into geographically distributed species (Martin *et al.* 2002); Geml *et al.* (2006, 2009) found several geographic clades within *Amanita muscaria sensu lato*. However, even when using several genes, phylogenetic approaches do not directly allow delineation of biological species and gene flow. The Phylogenetic Species Concept (Taylor *et al.* 2000) was applied to delineation of biological species, e.g. in the EM *Cenococcum geophilum* (Douhan *et al.* 2007). However, a combination of population genetics and phylogenetic approaches may improve our understanding of trans- and inter-continental EM populations, in terms of biological species and history of populations.

This study focuses on the EM basidiomycete *Laccaria amethystina* (i) at continental scale, and (ii) by combining population genetics and phylogenetic approaches. *L. amethystina* individuals result from mating without nuclear fusion between different haplonts (because of two self-incompatibility genes; Niculita-Hirzel *et al.* 2008). These haplonts are transient and arise from the germination of

10µm-large, wind-dispersed meiotic spores produced by fleshy fruitbodies. The recently sequenced genome of the related *L. bicolor* (Martin *et al.* 2008; <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) offers the first full genomic resources for an EM fungus. Although populations of *L. bicolor* have been studied (e.g. Selosse *et al.* 1999, 2001) at local scales, this species remains scarce in natural ecosystems. To the contrary, the Eurasian *L. amethystina* is a multi-host species (Roy *et al.* 2008) that fruits abundantly and forms high local diversities of small genets (genetic individuals) in Europe (Gherbi *et al.* 1999, Fiore-Donno & Martin 2001) and Japan (Wadud 2007). Investigating the population structure of *L. amethystina* at larger scale, Roy *et al.* (2008) did not detect significant genetic differentiation over 450km in France, suggesting that larger-scale studies could reveal some IBD. Moreover, limited portability of microsatellites between Europe and Japan suggests a possible differentiation at this distance (Donges *et al.* 2008; Roy *et al.* 2008). In all, technical and biological reasons make *L. amethystina* suitable for addressing the question of gene flow at two different continental (Europe / Eurasia) scales.

To study populations of *L. amethystina* at these two scales (10^3 and 10^4 km), we used the genomic resources of *L. bicolor* to design new markers, i.e. microsatellites (neutral markers) and coding (possibly non-neutral) loci to be added to previously defined markers. This revealed very long-distance dispersion in *L. amethystina* over Europe, but strong differentiation between European and Japanese populations, questioning their conspecificity. Our study raises questions and comments on gene flow and speciation for EM basidiomycete at continental level.

Materials and methods

Sampling and DNA extraction

Five hundred and nineteen fruitbodies of *L. amethystina* were collected in fall 2007 and 2008 from 12 European countries, with a maximum distance between two sites of 2900km (Fig. 1), and 36 fruitbodies were collected in fall 2008 on Mount Fuji, Japan (for site description, see Nara *et al.* 2003). We re-used 58 fruitbodies from two French populations, Orry and Bellême, from a previous study by Roy *et al.* (2008): FrO corresponds to 32 fruitbodies randomly sampled within the Orry population; FrB corresponds to 26 fruitbodies randomly sampled within the Bellême population. In all, 630 fruitbodies were used (Table 1). Since average genet diameter found in previous studies were ≤ 1.2 m (Gherbi *et al.* 1999; Fiore-Donno & Martin 2001; Wadud 2007), fruitbodies were collected at

more than 1.5m from each other to avoid redundant sampling of the same genet, on a stand surface limited to 300x300m. Fruitbodies were dried separately from each other before shipping, and then stored at -20°C. DNA extractions were done following the protocol described by Roy *et al.* (2008). Our initial sampling was meant to, but could actually not, be extended further to Eastern Europe and Western Asia, because of too scarce fructifications in 2007 and 2008.

Markers for population genetics

Eight microsatellites and locus IGS (Table 2) were used for genotyping. Four microsatellites (*La03*, *La17*, *La23*, *Ll35*) were previously published by Wadud *et al.* (2006a, 2006b) and *La171* and IGS were designed by Roy *et al.* (2008). Locus *La115*, published by Roy *et al.* (2008), was not used because of too frequent mis-amplifications as mentioned in this previous paper. We used the genome of *L. bicolor* (Martin *et al.* 2008) to detect further microsatellites loci portable to *L. amethystina*. Microsatellite repetition loci were detected on the *L. bicolor* genome (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) using the software MAGELLAN 1.1 (Lim *et al.* 2005) as in Labbé *et al.* (2008), and primers were designed with the online Primer3 tool (Koressaar & Remm, 2007). All candidate loci were verified by Blast to be in single copy on the genome of *L. bicolor*. The loci were screened with several steps (Table S1). Reproducible amplification was tested on non-fluorescent primers with a Tm gradient from 50 to 65°C, on a set of 4 *L. bicolor* and 8 *L. amethystina* DNAs (European origins). Amplicons were deposited on electrophoresis gels, to check for each the presence of single bands, and the expected size was compared to the genome sequence. Loci portable to *L. amethystina* were then tested with fluorescent primers, and used on a set of 32 European DNAs of *L. amethystina* to test for polymorphism. On 233 microsatellite loci designed on the genome of *L. bicolor*, only 3 of them (*Jl1195M13*, *Jl1209M5*, *Lv257*: their sequences were deposited on Genbank, GQ483297-483302) proved portable to *L. amethystina* and polymorphic (Table S1). For genotyping, microsatellite loci and the polymorphic IGS fragment were amplified following Roy *et al.* (2008), with Tm temperatures for PCR as in Table 2. Detection of labelled PCR products was carried out on an ABI PRISM 3130 XL Genetic analyser (Applied Biosystems), and fragment sizes were analysed with Genemapper 3.7 (Applied Biosystems), using default parameters for microsatellite analysis. On 630 DNAs genotyped, 7 did not amplify for at least two loci and were discarded for analysis of data.

Data analysis for population genetics

Allelic frequencies, departure from Hardy-Weinberg equilibrium, expected and observed heterozygosities (H_e , H_o) as well as linkage between loci were calculated with GENEPOP'007 (Rousset 2008). To assess the discriminating power of our set of markers, a probability of occurrence by chance was calculated for each genotype based on allelic frequencies considering all available fruitbodies as in Bergemann & Miller (2002). A correspondence factorial analysis (CFA) using multi-locus genotypes data was performed with Genetix4.05.2 (Belkhir *et al.* 1996–2004) to detect any possible Wahlund effect inside each population, and presence of null alleles was tested for each locus using Microchecker (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Wright indices (F_{IS} , F_{ST}) were calculated with GENEPOP'007. Selfing rates (s) were calculated based on F_{IS} ($2 F_{IS}/(1+F_{IS})$) or using the RMES software (David *et al.* 2007), using the multilocus correlation structure to derive estimates of s independent of F_{IS} and of technical biases and insensitive to the presence of null alleles. To detect IBD, correlations between genetic distances ($F_{ST}/(1-F_{ST})$) and geographic distances were calculated by Mantel tests implemented in GENEPOP'007, with 10000 permutations. Similarly, Mantel tests were done, contrasting genetic distances with latitude, longitude, altitude, temperature, or precipitations, with climatic data from WorldClim (Hijmans *et al.* 2005). We searched for spatial genetic structure at two levels: (i) the European level, including 16 European populations, and (ii) the Eurasian level, by adding Japanese population to the previous ones. In both cases, we performed CFA on populations as previously, and used the Bayesian approach-software Geneland (Guillot *et al.* 2008) and Structure 2.2 (Pritchard *et al.* 2000), with tested number of clusters ranging from $K=1$ to 16 (or 17 for the Eurasian level), and 10000 iterations. In Structure 2.2, we tested the 4 possible *a priori* parameters sets (ancestry model with or without admixture, associated with allelic frequencies correlated or independent), but this did not produce any difference in the evolution of $\ln$ (likelihood of data) with the number of clusters (not shown). The amount of variance linked to the differentiation between European and Japanese populations was estimated by an AMOVA with the Arlequin v 3.0 software (Excoffier *et al.* 2005).

Sequencing of coding loci

Coding genes were amplified from 33 *Laccaria amethystina*, i.e. one or two samples for each investigated population, plus 2 samples from Ukraine (M. Prydiuk) and Belarus (P. Kolmakov). We

also included 3 samples of *L. bicolor* from France (D. Mousain and L. Vincenot) and 1 from Serbia (D. Krstajic), and 1 fruitbody of each of the following species: *L. amethysteo-occidentalis* from the USA (F. Richard), *L. laccata* (D. Mousain), *L. anglica* [PAM0090406], *L. scotica* [PAM0010112], *L. proxima* [PAM01102104], *L. moelleri* [PAM97090101], *L. macrocystidiata* [PAM99082801], *L. oblongispora* [PAM01042805] (names between brackets are those of the collectors; the 5 last species were collected in France by P-A. Moreau, their numbers are accessions in his herbarium at Université de Lille). For these 45 samples, we tentatively amplified and sequenced five loci: the ITS region, the mitochondrial genes for large and small subunits of rRNA (*LrRNA* and *SrRNA*, respectively), and 2 nuclear genes with primers targeted on the genome of *L. bicolor* (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) coding for the glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*) and the nitrate reductase (*NAR*). Primers and PCR conditions are summarized in Table 3. PCR thermocycling was an initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30s, annealing at appropriate *T_m* (Table 3) for 60s and extension at 72 °C for 45s, with a final extension at 72 °C for 10min. PCR products were sequenced from both strands using PCR primers, and sequences were manually corrected and aligned using the software Seqscape 2.6 (Applied Biosystems). Corrected sequences were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – accessions GQ406389 to GQ406568).

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were conducted using maximum-likelihood (ML) and Bayesian methods, in PhyML (Guindon & Gascuel 2003) and MrBayes 3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) respectively. All available sequences for each locus (ITS, *G6PD*, *NAR* and mitochondrial *LrRNA* and *SrRNA*) were included, plus the corresponding sequence of *L. bicolor* genome (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>) for nuclear loci, and sequences from the UNITE (Kõljalg *et al.* 2005) and GenBank (Benson *et al.* 2008) databases. The best-fit evolutionary model was determined by comparing different evolutionary models with varying values of base frequencies, substitution types, α -parameter for the γ -distribution of variable sites, and proportion of invariable sites *via* hierarchical likelihood ratio tests using Paup* (Swofford, 2002) and MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). For the Bayesian method, all dataset were tested (i) with gaps considered as no data, and (ii) with gaps encoded in a matrix of indels (only the first option was used in PhyML). Analyses were first performed on each locus separately (for all loci, Bayesian and ML analyses provided the same

topologies, thus only Bayesian trees are presented here). Since concatenation would have implied only 24 taxa for which we could sequence all the 5 loci, and since mitochondrial were poorly informative (see below), we preferred to build a supermatrix for nuclear loci grouping all taxa for which at least 2 nuclear sequences were available. This 44 taxa- supermatrix was analysed as other alignments in MrBayes 3, taking missing data into account for the construction of phylogenies.

Results

Genetic diversity within populations

The 9 microsatellite markers were polymorphic in European populations, with 3 to 12 alleles never exceeding 0.89 in frequency (Table 4). Five loci had allele frequencies below 0.6. The pattern of allelic richness was different for the Japanese population: *La03* and *Lv257* were monomorphic, three loci showed two main alleles (frequencies above 0.29), while the four others had more balanced distribution of allelic frequencies (Table 4). Mean allelic richness was 33 alleles per population, ranging from 21 to 38 alleles. Noteworthy, out of 16 European populations, only seven harboured 1 to 4 private alleles, with frequency above 0.002. In sharp contrast, the Japanese population had 13 private alleles (Table 4), with frequencies ranging from 0.001 to 0.028.

We found 606 multi-locus genotypes out of 623 individuals. Six genotypes were represented by more than one fruitbody within a single population (Table 4). The maximal probability of occurrence by chance for all the observed multilocus genotypes was 0.001, and 5.2×10^{-4} for the genotypes shared by several fruitbodies within a population.

Inbreeding within populations

All populations showed a tendency to heterozygote deficiency (Table 5). Heterozygote deficiency was significant for more than half of the populations for 5 loci: *Jl1195M13*, *Jl1209M5*, *La17*, *La171* and *Ll35*. However, the populations were not significantly out of Hardy-Weinberg equilibrium for the four remaining loci: *La03*, *La23*, *Lv257* and the IGS (which is unlikely to provide null alleles). This discrepancy suggests that null alleles contribute to the apparent heterozygote deficiencies for some markers. Since no null homozygote was found (except for *La171* in the Japanese population), their frequency was expected to be low.

Because of putative null alleles for 5 loci mentioned above, we calculated F-statistics for (i) all 9 loci and (ii) the subset of four unbiased loci showing Hardy-Weinberg equilibrium. F_{IS} values were high when using the 9 loci, from 0.18 (population Swe) to 0.49 (population FrO; Table 5); it lowered more or less when using the four-loci subset, ranging from -0.09 to 0.32 for European population (as an exception, the F_{IS} was negative in both cases for the Japanese population due to monomorphic loci; Table 5). Selfing rates based on F_{IS} values were high (0.31 to 0.66 when using the 9 loci). Using the RMES method, analysing correlation of heterozygosity between different loci, the estimated selfing rate was lower and more contrasted among populations (0.008 to 0.267). These selfing rates did not correlate to these estimated from F_{IS} values, and none of the calculated rates correlated to forest age (Table 1).

Linkage disequilibrium between pairs of markers was found for the pairs *La17-La171* and *La171-Lv257* in the FrO population only (a population having the lowest selfing rate calculated with the RMES method). Over Europe, only *La17* and *La171* showed linkage disequilibrium. No association between loci was detected in other populations after Bonferroni's correction. Thus, although *L. amethystina* populations showed some inbreeding, recombination through sexual reproduction occurs within populations.

Geographic structure over Europe

Most genotypes (606/623) were specific to a single population. Ten genotypes only were shared by 2 populations, and one by 3 populations (from Estonia, England, Denmark); their probabilities of occurrence by chance ranged from 1.3×10^{-6} to 5.8×10^{-4} . The F_{ST} between pairs of populations in Europe were between 0.001 (Belgium – England) and 0.134 (Finland – France Bellême), with a European F_{ST} of 0.041 when calculated with all loci (Table 6). Among 120 pairwise F_{ST} , 82 are lower than 0.05, and only 6 populations had $F_{ST} > 0.10$ with another population. Using the subset of 4 unbiased loci, the European F_{ST} value was lower (0.032), and F_{ST} between populations more variable, from -0.015 (GermanyF – Austria) to 0.174 (Finland – France Bellême). Unexpectedly, the Finish population significantly differed from 8 other populations (Table 6). However, no clear geographic structure of the European populations emerged. Congruently, a Mantel test comparing geographic distances and genetic differentiation showed no strongly significant IBD ($r=0.098$, $P=0.056$; Fig. 2a). No correlation to latitude, longitude, elevation, mean annual temperature, rainfall

or age of the host forest was found (not shown). A CFA on the 16 European populations did not distinguish any population (Fig. 3a). The software Structure suggested that, whichever the prerequisites on ancestry model and allelic frequencies, one single population was the most likely scenario (Fig. S1); similarly, five runs of Geneland indicated a maximum *a posteriori* estimate for one single population (not shown). Thus, there was no IBD over 2900km in Europe.

Structure between Europe and Japan

As previously suggested, the Japanese population harboured numerous private alleles (for the 9 loci) and null alleles (with 67% of null homozygotes at locus *La171*, a genotype never encountered in Europe). In an AMOVA, 35.5% of the molecular variance was explained by the differentiation between the European population as a whole and the Japanese one (significant at $P < 10^{-5}$), while differentiation among European populations and diversity within population accounted for 2.9% and 61.6% of the variance, respectively. Pairwise F_{ST} between Japanese and European populations (from 0.393 to 0.466) were always significantly higher than within Europe, and the F_{ST} between Europe and Japan was 0.417 (based on 9 loci) or 0.447 (based on the 4 unbiased loci; Table 6). A CFA under Genetix distinguishes a European cluster and the Japanese population, with the first axis explaining 68.1% of variance (60.7% when using the 4 unbiased loci; Fig. 3b). The allelic diversity in the Japan population was similar to that in European populations (37 *versus* 30.5 ± 4.8), and both populations did not show only a subset of the diversity in the other one. Thus, no recent founder effect could explain the differences. Analyses using the softwares Structure and Geneland distinguished two clusters *a posteriori* (Fig. S1), and the later analysis provided a probability of 1 for all European populations to belong to the first cluster, and of 1 for the Japanese populations to belong to the second one. A Mantel test showed a very significant correlation between geographic and genetic distances ($r=0.967$, $P=0.004$; Fig.2b), driven by the extreme values involving the Japanese population. In all, a strong IBD was found between Europe and Japan populations.

Geographic diversity for coding loci

ITS sequences were obtained for 47 fruitbodies (including 11 non-*L. amethystina*, accessions GQ406458-GQ406468). Two datasets were prepared: a restricted one containing all the author's

sequences, plus sequences from the UNITE database (Kõljalg *et al.* 2005) with well-identified fruitbodies (29 taxa); and a second containing all available *Laccaria* ITS (i.e. adding GenBank data – 138 taxa in all). Both datasets showed many non-supported groups and considerable confusion for brown *Laccaria* spp. (*L. laccata* and *L. proxima* mainly, Fig. S1). However, the topology and supported clades for the taxa under study were similar for both datasets: the *L. amethystina* sequences clustered into two strongly supported geographic clades, i.e. a Japanese and a European clade (Fig. 4). Interestingly, a North American *L. amethystina* sequence tended to cluster, with weak support, with the Japanese clade (with a 89% support value Fig.S1). Nucleotidic variations were low within Europe (at least 99.7% identity) and Japanese sequences were 97.5% identical to the European consensus sequence. As compared to European sequences, Japanese ITS showed a 12 bp deletion and two (2 and 4 bp) insertions (Fig. S3); unexpectedly, the American sequence was intermediate between European and Japanese sequences for indels and nucleotide polymorphism (Fig. S3).

We obtained 39 *NAR* sequences (including 8 non-*L. amethystina*, GQ406531-GQ406540) that formed two sister geographic clusters in a Bayesian analysis (Fig. 5a), with the Swedish *L. amethystina* sequence from Genbank unexpectedly placed out of the well-supported *L. amethystina* / *L. amethysteo-occidentalis* clade. Ignoring this sequence, European sequences were at least 98.2% similar, and differed by 4.7% from the Japanese ones. We obtained 33 *G6PD* sequences (including 10 from non-*L. amethystina*, GQ406340, GQ406413-GQ406416 and GQ406418-GQ406421). A Bayesian analysis also supported two sister geographic clusters, but Japanese *L. amethystina* clustered with *L. amethysteo-occidentalis* excluding European accessions (Fig. 5b). European sequences formed two clusters without any geographic trend (they occurred simultaneously in 5 populations at least; Fig. S4). Both of these two groups differed from sequences of Japanese *L. amethystina* by 23 ponctual mutations, corresponding to 5 and 4 non-synonymous mutations (for Group 1 and 2, respectively; Fig. S4). Sequences of Japanese *L. amethystina* and North-American *L. amethysteo-occidentalis* differed by 25 mutations, 2 of them being asynonymous. No stop codon was present in any of the *G6PD* sequences. Mitochondrial genes for large and small ribosomal subunits showed a low variability (GQ406469-GQ406501 and GQ406541-GQ406568 respectively) and Bayesian analyses showed low support values (Fig. S5), and European and Japanese accessions were often mixed. Thus, no differentiation was found for this mitochondrial gene.

Concatenating the three nuclear genes, a Bayesian analysis of a nuclear supermatrix including all samples for which at least two nuclear genes were sequenced confirmed that the Japanese *L. amethystina* clade is distinct from the European one (Fig. 5c), with *L. amethysteo-occidentalis* placed at the basis of the *L. amethystina* clade.

Discussion

Reproductive biology of Laccaria amethystina

Nine neutral markers revealed high local genotypic diversities within populations (97 to 100% of the fruitbodies had unique genotypes), congruently with previous reports (Gherbi *et al.* 1999). Rare fruitbodies, within or among populations, shared an identical genotype. These found twice within a population and these occurring in different populations (that are unlikely to represent clones in a species dispersed by meiotic spores, Fries 1983) had similar probabilities of occurrence by chance. Moreover, the distance between sampled fruitbodies was above genet size (see Material and Methods), so we probably did not re-sample the same genet. Anyway, our analyses (not shown) did not differ when discarding genetically identical fruitbodies (as in Roy *et al.* 2008).

Populations showed elevated inbreeding coefficients (F_{IS} from 0.18 to 0.49), and all loci showed the same patterns within each population. Heterozygote deficiencies were thus high, as in Fiore-Donno & Martin (2001), Wadud *et al.* (2006a) and Roy *et al.* (2008). This could either reflect (i) a Wahlund effect, (ii) the presence of null (or very weakly amplifying) alleles, (iii) a trend to autogamy, or a mix of these components. No Wahlund effect was detected in CFAs within populations (data not shown). The presence of null alleles may occur in our dataset (although null homozygous were only found for locus *La171* on Japanese samples). A tendency to inbreeding persisted even when discarding the five loci showing significant heterozygote deficiency, and, most importantly, when using an independent method, not sensible to null alleles (RMES; $s=0.01$ to 0.27).

We thus favour that inbreeding between kin spores produces local heterozygote deficiencies, that have often been described in this and other basidiomycetes species (see discussion in Roy *et al.* 2008). Abundant fruiting entails high production of meiotic spores, most of which fall within few meters around the fruitbody in cap fungi (Li, 2005). This may favour settlement close to parental genets, through mating among sister haplonts (the incompatibility system in Basidiomycetes allows mating with 25% of the meiotic spores from the same parent; Niculita-Hirzel *et al.* 2008). These haplonts may interact with parental genet in a mating between haploid and dikaryotic individuals

typical for Basidiomycetes (the ‘Büller phenomenon’, described for *Laccaria* spp.; de la Bastide *et al.* 1995). Exploring kinship relationships between individuals at fine, local scale deserves further studies, implying exhaustive samplings of local populations over several years, taking into account belowground genets (as in Guidot *et al.* 2004 or Van der Linde *et al.* 2008). However, *L. amethystina* remains largely outcrossing: the absence of linkage disequilibrium in all populations, but one, indicates that allogamous sexual reproduction and recombination indeed dominate within populations.

No geographical structure over Europe

We found no or few genetic differentiation over Europe, from Northern Spain to Estonia (F_{ST} values from 0.001 to 0.134) and no IBD of over 2900km (Mantel test: $r= 0.098$, $P= 0.056$), in congruence with the lack of genetic structure over 450km in France previously reported (Roy *et al.* 2008). Only the Finish population, the most northern one, showed differentiation with most, but not all other Europe population: since it has no private alleles, shows a standard genotypic diversity and does not differ from the most distal (Spanish) population, IBD may not account for this observation. This pattern was visible through neutral markers, but also reflected in the low sequence variation at loci under selection. This absence of IBD may indicate a large panmictic European *L. amethystina* population, with extensive gene flow. Another, less likely explanation would be the retention of an ancient polymorphism, without loss of ancestral alleles due to a very large effective size (unfortunately, in spite of the abundance of *L. amethystina*, N_e of this species remains not estimated). Private alleles, which may exist due to local mutations, remain scarce (frequencies from 0.001 to 0.003) and the pattern of common alleles supports the hypothesis of panmixy.

A European-scale panmictic population with a high gene flow at this scale is a new model for EM biogeography, with few comparisons in other fungal species, EM or not. Previous studies of EM species extended over 1500km at most, and demonstrated a more or less pronounced IBD, mainly explained by the dispersal mode. For example, *Rhizopogon vesiculosus*, dispersed by mycophagous animals, shows IBD on a 5km-distance (Kretzer *et al.* 2005), and populations of the non-sporulating *Cenococcum geophilum* are significantly isolated over 250 km (Jany *et al.* 2002). IBD occurs at longer distances for species dispersed by airborne spores: Xu *et al.* (2008) showed strong IBD for populations of *Tricholoma matsutake* over 1050km, and Bergemann & Miller (2002) detected very high differentiation ($F_{ST}=0.43$, as between Europe and Japan in this study) among *Russula brevipes* populations separated by 1500km. Phylogeographic analyses revealed a strong intra-continental

‘ecoregional endemism’ in Northern America for *Amanita muscaria* (Geml *et al.* 2008), another wind-dispersed and abundantly fruiting species. LDD occurs among phytopathogenic fungi, e.g. causing the expansion of *Melampsora larici-populina* from Europe to Canada (Barrès *et al.* 2008), but contrarily to our pattern, a strong IBD existed over 2000km, with high differentiation among European populations; populations of the wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum* show low differentiation among continental populations (e.g. $R_{ST}=0.01$ between Mexico and Australia, or between China and Denmark; Stukenbrock *et al.* 2006), more comparable to the values found for *L. amethystina*. Several aerobiological studies confirm the strong potential of LDD of microbial spores by major wind streams (Prospero *et al.* 2005; Hervas *et al.* 2009).

Several non-exclusive explanations exist for the pattern for *L. amethystina* in Europe. Major examples of LDD for microbial species imply single-step or gradual wind-dispersal of propagules, and anthropic dispersal that cover longer distances than airstreams (Brown & Hovmøller 2002; Desprez-Loustau *et al.* 2009). For *L. amethystina*, gene flow relayed by human dispersal (e.g. nurseries exchanges) seems improbable in Europe, where this late-stage species propagates in nature forests rather than on mycorrhizal seedlings or in disturbed environments. Spontaneous aerial, gradual and multidirectional dispersal of haploid spores thus seems the most likely process operating in European *L. amethystina* populations. Landscape barriers, more than distance, hampers aerial gene flows, e.g. mountains for *Tricholoma matsutake* (Amend *et al.* 2009) or sea channels for *Rhizopogon* populations (Grubisha *et al.* 2007). Over Europe, aerial LDD could be favoured by the absence of major geographic barrier (neither high mountain chains nor sea channels larger than 50km) to airstreams. However, assignation tests (not shown) performed on fruitbodies of small populations from Corsica or Central Europe, separated by the Alps from the studied area, suggested that they belonged to the same population (not shown), so that the high gene flow and spore dispersal may relate on the biology of *L. amethystina* itself.

Patchiness and species diversity of host communities, sometimes fragmented by anthropic disturbances, often prevent the dispersal of fungal natural populations on thousands of kilometres (Brown & Hovmøller, 2002). For the wood saprotrophic fungus *Datronia caperata*, high levels of host specificity exacerbate the effect of fragmentation of the habitat, and thus IBD (Parrent *et al.* (2004). Edman *et al.* (2004) studied the abundance and viability of spores of two wood saprotrophic Basidiomycetes, *Fomitopsis rosea* and *Phlebia centrifuga* in Sweden boreal forests, and observed that the dispersal and germination potential of spores were affected by habitat fragmentation. The

situation is quite different in *L. amethystina*, a true multi-host, non-specific EM species (Roy *et al.* 2008), since EM forests show a continuous distribution in North and West Europe (1 to 100% of forest area per km²; data from European Forest Institute), facilitating a population continuum, and thus gene flow. In the comparable model *Russula brevipes*, Bergemann & Miller (2002) showed that the host population patchiness is not a barrier to gene flow for the EM species. Moreover, *L. amethystina* seems to have a large ecological range, since we found no correlation between the population differentiation and the age of the forest stand, the climatic conditions or the geographic position (altitude / latitude).

In all, the lack of strong geographical barriers in Europe, and, more likely, the generalist ecological strategy of *L. amethystina* likely favour gene flow over long distances and prevents local genetic drifts in Europe. Other intrinsic population features specific unique to *L. amethystina* among EM species may contribute. A high diversity of small genets (up to 14660 genets/ha, Fiore-Donno & Martin 2001), suggesting a high N_e , together with a high genet turnover from one year to another Gherbi *et al.* (1999) may enhance gene turnover within populations. These features need re-investigation using the newly available markers over small scales, as stated above. Noteworthy, *A. muscaria*, a species with similar aerial spore dispersion to *L. amethystina* but strong intra-continental structure (Geml *et al.* 2009), the main differences are the higher genet lifespan and area in *A. muscaria* (Bagley & Orlovich, 2004). Last, high spore germination potential (among the highest for EM fungi for Japanese *L. amethystina* spores; Ishida *et al.* 2008) combined with abundant fruiting, and thereof high spore production, may enhance long-distance colonization and gene flow. One could even speculate that the local inbreeding due to high spore rain could be a by-product of the selection of high spore production to allow LDD of some spores. In the coming years, population studies of diverse EM species (differing by host or ecological specificity, size or lifespan of genets, sporulating effort, etc.) would help clarifying the factors determining the strength of IBD.

Strong geographical structure (and possible speciation) over Eurasia

Coupling neutral and selected molecular markers over a 10000km Eurasian scale revealed two diverging populations of *L. amethystina* in Japan and Europe, as suspected in recent works (Roy *et al.* 2008; Donges *et al.* 2008). Although they meet the criterion of $\geq 97\%$ ITS similarity usually applied to delineate conspecific fungi (Hughes *et al.* 2009), neutral markers showed a very strong differentiation between populations ($F_{ST}=0.43$). Moreover, IBD rate over Eurasia (10000km) was not congruent with extrapolation of IBD rate over Europe (Fig. 2b). This suggests that cumulative effects

of a low IBD may not be involved. Phylogenetic approaches on non-neutral, nuclear coding loci (ITS, *NAR1* and *G6PD*) proved that Japanese nucleotidic haplotypes were not present in European populations, and vice-versa for all loci. A lower differentiation was found for mitochondrial ribosomal genes – congruently, 99.98% similarity over 1839 bp was reported between American and European *L. bicolor* mitochondrial LrDNA (Selosse *et al.* 1998), suggesting that mitochondrial genes may evolve more slowly than nuclear ones. Furthermore, molecular discrepancies were observed for microsatellites: according to Donges *et al.* (2008), Roy *et al.* (2008) and this study, only three (*La03*, *La17*, *La23*) out of nine markers designed for Japanese *L. amethystina* by Wadud *et al.* (2006a) were reproducible and polymorphic on European samples while loci *La07*, *La12* and *La14* did not even amplify with European material. Reciprocally, some markers designed on European samples were either monomorphic (*Lv257*) or produced null homozygotes (*La171*) in Japanese population. Moreover, ecological differences are documented: European populations are late-stage EM partners of mature forests (Gherbi *et al.* 1999; Fiore-Donno et Martin 2001) hitherto uncultivable (Le Tacon & Selosse, unpubl. observations), whereas the Japanese *L. amethystina* population is a pioneer species easily cultivable (Nara *et al.* 2003; Wadud 2007). Limited morphological investigations also suggest subtle differences (Greg Mueller, personal communication).

Sibling taxa, hardly or non distinguishable by morphology, were often found in fungi by molecular tools at inter-continental scales (Halling *et al.* 2008), probably due to a trend to allopatric speciation. Such taxa pairs were documented by phylogenetic approaches using one or more genes between Paleo- and Neotropics (e.g. the phytopathogenic *Moelleriella* spp., Liu *et al.* 2009), within the southern Hemisphere (e.g. the phytopathogenic *Leptosphaeria biglobosa*, Vincenot *et al.* 2008; the saprotrophic *Ganoderma* spp., Moncalvo & Buchanan, 2008; the EM *Tylopilus* spp., Halling *et al.* 2008), between Europe and North-America (e.g. the saprotrophic *Artomyces pyxidatus*, Lickey *et al.* 2002 and *Lentinula* spp., Hibbett *et al.* 2001), between Asia and North-America (e.g. the saprotrophic *Serpula lacrymans*, Kauserud *et al.* 2007, and *Grifolia frondosa*, Shen *et al.* 2002; the EM *Suillus* spp., Wu *et al.* 2000), or at more global scale (e.g. the EM *Pisolithus tinctorius*, Martin *et al.* 2002 and *Amanita muscaria*, Geml *et al.* 2009). In some cases, gene flow still occurred (Moncalvo & Buchanan, 2008). To our knowledge, *L. amethystina* is the first recorded fungal sibling taxa over Eurasia for EM fungi. A similar claim was made for the saprotrophic *Megacollybia platyphylla* over Eurasia (Hughes *et al.* 2007) based on ITS sequences divergence only, and without population analysis. Whereas the previous isolation is linked to obvious geographical barriers, no such obstacles prevent aerial exchanges in Eurasia, which is continuously covered with EM forests.

Possible causes for IBD over Eurasia

Any recent founder event is unlikely to explain the data: both European and Japanese populations are molecularly diverse (whereas recently founded populations are less diverse, e.g. Kasanen *et al.* 2004) and there no evidence that molecular diversity in one population is nested in the other (whereas the diversity of recently founded populations is nested in the diversity of the mother population; Barrès *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009). We propose two equally parsimonious, non-exclusive explanations: ancient allopatric speciation (i.e., molecular similarities are plesiomorphic traits) or gradual variation due to IBD (i.e., molecular similarities also result from rare gene flow).

An ancient allopatric speciation, followed by molecular diversification, may have shaped this differentiation. One scenario is that separate refugees were colonized in Asia and Europe during past ice age(s), as was previously illustrated for some EM truffles: refugees in North, or South and Central Italy during the last ice age, followed by recolonization of northern regions accompanying the migration of host trees was postulated for *Tuber melanosporum* (Murat *et al.* 2004) and *T. magnatum* (Rubini *et al.* 2005). This scenario allows different environment to have shaped the ecological differences recorded above. It predicts that molecular differences do not accumulate gradually over Eurasia, but that a frontier between the two populations may exist. This does not exclude a hybrid zone, or even some rare LDD events as suspected in other Basidiomycetes (Moncalvo & Buchanan, 2008; Hosaka *et al.* 2008).

A gene flow limited by distance over 10000km may also produce a gradual variation within a continuously distributed species. The prediction of a gradual genetic variation of population between Europe and Asia, contrasting with the previous scenario, is testable, since the *L. amethystina*-like taxa exist in China and Siberia (Zhu L. Yang and Tatyana Svetasheva, personal communications). The question is even more exciting when considering North American *Laccaria* species: North American *L. amethystina* ITS shows an intriguing mix of Japanese and European traits, and the exact link of *L. amethysteo-occidentalis* with Japanese *L. amethystina* also deserves further analysis. An appealing hypothesis is that *L. amethystina* undergoes a ring speciation all over the Northern Hemisphere, showing a gradual population variation between two divergent and sympatric forms (Irwin, 2001), here *L. amethysteo-occidentalis* and *L. amethystina* in North America. So far, few biological examples of true ring speciation actually exist (Irwin, 2001), and none for fungi.

Perspectives

Our results support high local genet diversity and panmictic pattern previously reported for *L. amethystina* in Europe, highlighting the importance of outcrossing sexual reproduction. Finer estimation of genet turnover, selfing level and genet diversity may explain gene flow at higher scales, and small-scale re-investigation of populations at using recently obtained microsatellites are now needed. As for many fungal species, estimates of potentials for spore dispersal (e.g. proportion of spores capable to escape in higher airstreams for LDD) would improve our understanding of gene flow.

In vitro crossing tests may evaluate how far genetic divergences reflect reproductive isolations. Prezygotic isolation can easily be tested *in vitro* (as already done for American and European *L. bicolor*; Selosse *et al.* 1998), but testing post-zygotic isolation will require the production of F1 sporulating fruitbodies (Moncalvo & Buchanan, 2008). So far, although Japanese *L. amethystina* strains are easy to culture and inoculate on host seedlings (producing many sporocarps; Nara, 2005), these tests have been hampered by non-cultivability of European strains.

Further analyses of the *L. amethystina* complex, with a combination of population genetic and phylogenetic analyses, are promising for tackling on-going speciation events. Since many conclusions in this study are based on a single Japanese population, next studies should include more samples from Japan. To better investigate the IBD between 2900 and 10000km, other populations from continental Asia are also required, as well as from around the Beringia that turns out to have a main importance in EM biogeography (Wu *et al.* 2002; Gernl *et al.* 2006, 2009). In a context where too few phylogeographic hypotheses are available for EM fungi (as compared to saprobes; Halling *et al.* 2009), this would elucidate the biogeography of purple *Laccaria*, and a new model of EM fungal evolution over Eurasia, if not all over the Northern Hemisphere.

References

- Amend A, Garbelotto M, Fang Z, Keeley S (2009). Isolation by landscape in populations of a prized edible mushroom *Tricholoma matsutake*. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-009-9894-0.
- Barrès B, Halkett F, Dutech C, Andrieux A, Pinon J, Frey P (2008). Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution*, **8**, 577-587.

- Belkhir K *et al.* (1996). *GENETIX 4.05, Logiciel sous Windows pour la Génétique des Populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2008). GenBank. *Nucleic Acids Research*, **36**, D25-D30.
- Bergemann SE, Miller SL (2002). Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytologist*, **156**(2), 313-320.
- Brown JKM, Hovmøller MS (2002). Epidemiology – Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, **297**(5581), 537-541.
- Carriconde F, Gardes M, Jargeat P, Heilmann-Clausen J, Mouhamadou B, Gryta H (2008). Population evidence of cryptic species and geographical structure in the cosmopolitan ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma scalpturatum*. *Microbial Ecology*, **56**, 513-524.
- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, **16**(12), 2474-2487.
- De La Bastide PY, Kropp BR, Piché R (1995). Vegetative interactions among mycelia of *Laccaria bicolor* in pure culture and in symbiosis with *Pinus banksiana*. *Canadian Journal of Botany*, **73**(11), 1768-1779.
- Den Bakker HC, Zuccarello GC, Kuyper TW, Noordeloos ME (2007). Phylogeographic patterns in *Leccinum* sect. *Scabra* and the status of the arctic-alpine species *L. rotundifoliae*. *Mycological Research*, **111**, 663-672.
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti M, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, Vincenot L, Gout L, Rouxel T (2009). The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology*, in press.
- Donges K, Schlobinski D, Cremer E, Rexer KH, Kost G (2008). Six newly developed microsatellite markers of *Laccaria amethystina*, using an improved CSSR approach. *Mycological Progress*, **7**(4), 285-290.
- Douhan GW, Hurn KL, Douhan LI (2007). Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. *Mycologia*, **99**(6), 812-819.
- Dunham SM, Kretzer A, Pfreder ME (2003). Characterization of Pacific golden chanterelle (*Cantharellus formosus*) genet size using co-dominant microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **12**(6), 1607-1618.
- Edman M, Gustafsson M, Stenlid J, Ericson L (2004). Abundance and viability of fungal spores along a forestry gradient – responses to habitat loss and fragmentation? *Oikos*, **104**, 35-42.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Fiore-Donno AM, Martin F (2001). Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist*, **152**(3), 533-542.
- Fries N (1983). Spore germination, homing reaction, and intersterility groups in *Laccaria-laccata* (Agaricales). *Mycologia*, **75**(2), 221-227.
- Geml J, Laursen GA, O'Neill K, Nusbaum HC, Taylor DL (2006). Beringian origins and cryptic speciation events in the fly agaric *Amanita muscaria*. *Molecular Ecology*, **15**(1), 225-239.
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA, Martin F (1999). High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology*, **12**(8), 2003-2013.

- Goodwin SB, Cohen BA, Fry WE (1994). Panglobal distribution of a single clonal lineage of the Irish potato famine fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(24), 11591-11595.
- Grubisha LC, Bergemann SM, Bruns TD (2007). Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology*, **16**, 1811-1822.
- Guidot A, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R (2004). Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, **161**(2), 539-547.
- Guillot G, Santos F, Estoup A (2008). Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, **24**(11), 1406-1407.
- Guindon S, Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, **52**(5), 696-704.
- Hawksworth DL (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, **105**, 1422-1432.
- Hervas A, Camarero L, Reche I, Casamayor OE (2009). Viability and potential for immigration of airborne bacteria from Africa that reach high mountain lakes in Europe. *Environmental Microbiology*, **11**(6), 1612-1623.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **25**, 1965-1978.
- Hosaka K, Castellano MA, Spatafora JW (2008). Biogeography of Hysterangiales (Phallomycetidae, Basidiomycota). *Mycological Research*, **112**(4), 448-462.
- Irwin DE (2009). Incipient ring speciation revealed by a migratory divide. *Molecular Ecology*, **18**, 2923-2925.
- Ishida TA, Nara K, Tanaka M, Kinoshita A, Hogetsu T (2008). Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist*, **180**(2), 491-500.
- James TY, Porter D, Hamrick JL, Vilgalys R (1999). Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom, *Schizophyllum commune*. *Evolution*, **53**(6), 1665-1677.
- Jany JL, Garbaye J, Martin F (2002). *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist*, **154**(3), 651-659.
- Kausrud H, Svegård IB, Sætre GP, Knudsen H, Stensrud Ø, Schmidt O, Doi S, Sugiyama T, Högberg N (2007). Asian origin and rapid global spread of the destructive dry rot fungus *Serpula lacrymans*. *Molecular Ecology*, **16**(6), 3350-3360.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2005). Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology*, **14**(8), 2259-2268.
- Koressaar T, Remm M (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*, **23**(10), 1289-1291.
- Köljal U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vrålstad T, Ursing BM (2005). UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, **166**(3), 1063-1068.

- Labbé J, Zhang X, Yin T, Schmutz J, Grimwood J, Martin F, Tuskan GA, Le Tacon F (2008). A genetic linkage map for the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and its alignment to the whole-genome sequence assemblies. *New Phytologist*, **180**(2), 316-328.
- Lim S, Notley-McRobb L, Lim M, Carter DA (2005). A comparison of the nature and abundance of microsatellites in 14 fungal genomes. *Fungal Genetics and Biology*, **41**, 1025-1036.
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002). Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist*, **153**(2), 345-357.
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brotkstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmèisse R, Melayah D, Montanini B, Murat C, Mehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kuës U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardon PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **452**, 88-93.
- Moncalvo JM, Buchanan PK (2008). Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research*, **112**, 425-436.
- Mueller GM, Schmit JP, Leacock PR, Buyck B, Cifuentes J, Desjardin DE, Halling RE, Hjortstam K, Iturriaga T, Larsson KH, Lodge DJ, May TW, Minter D, Rajchenberg M, Redhead SA, Ryvarden L, Trappe JM, Watling R, Wu QW (2007). Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation*, **16**(1), 37-48.
- Murat C, Diez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F (2004). Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist*, **164**(2), 401-411.
- Nara K, Nakaya H, Wu B, Zhou Z, Hogetsu T (2003). Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist*, **159**(3), 743-746.
- Niculita-Hirzel H, Labbé J, Kohler A, le Tacon F, Martin F, Sanders IS, Kües U (2008). Gene organization of the mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci. *New Phytologist*, **180**(2), 329-342.
- Nylander JAA (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- O'Malley MA (2007). The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology*, **5**(8), 647-651.
- Parrent JL, Garbelotto M, Gilbert GS (2004). Population genetic structure of the polypore *Datronia caperata* in fragmented mangrove forests. *Mycological Research*, **108**, 403-410.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Prospero JM, Blades E, Mathison G, Naidu R (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, **21**, 1-19.

- Purdy LH, Krupa LH, Dean JM (1985). Introduction of sugarcane rust into the Americas and its spread to Florida. *Plant Disease*, **69**(8), 689-693.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**(12), 1572-1574.
- Rousset F (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.
- Roy M, Dubois MP, Proffit M, Vincenot L, Des marais E, Seloisse MA (2008). Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont. *Molecular Ecology*, **17**, 2825-2838.
- Rubini A, Paolocci F, Riccioni C, Vendramin GG, Arcioni S (2005). Genetic and phylogeographic structures of the symbiotic fungus *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(11), 6584-6589.
- Seloisse MA, Martin F, Bouchard D, Le Tacon F (1999). Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a Douglas fir plantation. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(5), 2006-2014.
- Seloisse MA, Martin F, Le Tacon F (2001). Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir. *Mycological Research*, **105**, 524-531.
- Smith SE, Read DJ (2008). Mycorrhizal symbiosis, 3rd edition. *Academic Press*, San Diego.
- Stukenbrock EH, Banke S, McDonald BA (2006). Global migration patterns in the fungal wheat pathogen *Phaeosphaeria nodorum*. *Molecular Ecology*, **15**, 2895-2904.
- Swofford DL (2002). PAUP* : phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.10 b. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **31**, 21-32.
- Taylor AFS, Hills AE, Simonini G, Both EE, Eberhardt U (2006). Detection of species within the *Xerocomus subtomentosus* complex in Europe using rDNA-ITS sequences. *Mycological Research*, **110**, 276, 287.
- Torriani SFF, Brunner PC, McDonald BA, Sierotzki H (2008). Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science*, **65**, 155-162.
- Van der Linde S, Alexander I, Anderson IC (2008). A PCR-based method to detect the mycelia of stipitate hydroid fungi in soil. *Journal of Microbiological Methods*, **75**(1), 40-46.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Ishida TA, Hogetsu T (2006). Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes*, **6**(1), 130-132.
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Hogetsu T (2006). Isolation and characterization of five microsatellite loci in an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Molecular Ecology Notes*, **6**(3), 700-702.
- Wadud MA (2007). Reproduction ecology of pioneer ectomycorrhizal fungi, *Laccaria amethystina* and *L. laccata*, in the volcanic desert on Mount Fuji. PhD thesis. Tokyo, Japan: the University of Tokyo.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 315-322. Academic Press, San Diego.
- Wu QX, Mueller GM, Lutzoni FM, Huang YQ, Guo SY (2000). Phylogenetic and biogeographic relationships of Eastern Asian and Eastern North American disjunct *Suillus* species (Fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences (2000). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**(1), 37-47.
- Xu J, Sha T, Li YC, Zhao ZW, Yang ZL (2008). Recombination and genetic differentiation among natural populations of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* from southwestern China. *Molecular Ecology*, **17**(5), 1238-1247.

Acknowledgements

We warmly thank Simon Egli, Andreas Gminder, Ibai Olariaga Ibarguren, Damjan Krstajic, Thomas Lassøe, Mireille Lenne, Daniel Mousain, Jorma Palmén, Stefan Raidl, Franck Richard, Maria Rudawska, Arne Ryberg, Stuart Skeates, Leho Tedersoo, Alexander Urban and Sietse Van der Linde for help in sampling, and Sébastien Leclercq for help in screening of microsatellites. We thank Joëlle Ronfort, Finn Kjellberg, Patrice David, François Rousset, Noppol Kobmoo, Pierre-Olivier Cheptou for help in population genetics, as well as Marc de Dinechin and Pierre-Henri Fabre for help in phylogenetic analyses. We also acknowledge Gerhardt Kost, Thomas Kuyper, Greg Mueller and Pierre-Arthur Moreau for inspiring discussions. This work was funded by the European Commission Network of Excellence EVOLTREE (to F.M. and M.-A.S.) and the Centre National de la Recherche Scientifique (ATIP to M.-A. S). Most molecular data used in this work were produced at the IFR119 ‘Montpellier Environnement Biodiversité’.

Author box

This work is part of L. Vincenot’s thesis on *Laccaria amethystina* population genetics. She has been doing the molecular typing and genetic analyses, with help from C. Sthultz, M.-P. Dubois and J. Labbé. K. Nara, C. Sthultz gave help in analysing the data and L. Vincenot, C. Sthultz and M.-A. Selosse wrote the paper. This project was designed by M.-A. Selosse with help of F. Martin.

Table 1 Main characteristics of the 17 sampling sites.

Population	Country	Site location	n ^a	Stand vegetation	Age of the forest ^b
Sco	Scotland	Kirkhill (57°21'30"N; -2°46'47"E)	41	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Larix</i> sp.	150-200 years
Eng	England	Newtown Common (51°25'47"N; -1°26'30"E)	40	<i>Betula pendula</i> , <i>Quercus robur</i>	50-100 years
Sp	Spain	Guipuscoa (43°07'16"N; -2°15'38"E)	38	<i>Fagus sylvatica</i>	120-150 years
FrB ^c	France	Bellême (48°22'36"N; 0°33'35"E)	26	<i>Abies alba</i> , <i>Carpinus betulus</i>	30-80 years
Bel	Belgium	Boisfort (50°49'43"N; 4°18'26"E)	46	<i>Fagus sylvatica</i>	250 years
FrO ^c	France	Orry-la-Ville (49°07'56"N ; 2°30'48"E)	32	<i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus robur</i>	20-50 years
FrL	France	Lyon (45°45'04"N; 4°46'60"E)	40	<i>Quercus</i> , <i>Carpinus</i>	25-50 years
CH	Switzerland	Eschenbach (47°09'24"N; 8°12'53"E)	43	<i>Picea abies</i>	20-80 years
GeF	Germany	Freising (48°29'52"N; 11°34'22"E)	36	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i>	60-80 years
GeGS	Germany	Gut Sunder (52°43'60"N; 9°49'00"E)	44	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i>	30-40 years
Aus	Austria	Rotwald (47°47'01"N; 15°03'29"E)	15	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i>	> 150 years
Pol	Poland	Łopuchówka (50°17'25"N; 22°58'13"E)	39	<i>Larix decidua</i> , <i>Fagus sylvatica</i>	80-110 years
Den	Denmark	Østerild (57°09'34"N; 8°43'53"E)	37	<i>Fagus sylvatica</i> , <i>Picea abies</i>	40-60 years
Swe	Sweden	Olofström (56°20'29"N; 14°26'06"E)	41	<i>Fagus sylvatica</i>	80 years
Fin	Finland	Ruissalo (60°31'03"N; 22°10'17"E)	32	<i>Quercus</i> sp., <i>Corylus</i> sp.	200-400 years
Est	Estonia	Järvelja (58°18'52"N; 27°15'23"E)	37	<i>Picea abies</i> , <i>Tilia Cordata</i>	80-100 years
Jap	Japan	Mont Fuji (35°20'24"N; 138°47'55"E)	36	<i>Salix reinii</i>	< 300 years

(a) n, number of genotyped sporocarps.

(b) age of the 2 most common tree species of the stand.

(c) FrB, FrO: populations from the study by Roy *et al.* (2008), under the names XX and XX respectively.

Table 2 Loci (microsatellites, rDNA stretch and other coding genes) and primers used in this study

Markers		Primers sequence (5'-3')		Tm (°C)	Fragment size (pb) ^a	Reference ^b
Microsatellites	<i>La03</i>	F: GAGAAAAATTGGTGAAACCCA	R: CAACTATGACATGCCAATTCTG	56	150-156, (ATG) ₅	Wadud <i>et al.</i> (2006a)
	<i>La17</i>	F: GCTGGGTCTCTCTTCCTAATC	R: GGAGTTGCGAAAGAGACATAG	56	119-140, (CAC) ₄	Wadud <i>et al.</i> (2006a)
	<i>La23</i>	F: GCCATCGTCGGATCAGCTTAC	R: GAGATTGAGAAGATGTACGAG	56	209-248, (CAC) ₅	Wadud <i>et al.</i> (2006a)
	<i>Ll35</i>	F: GCAATGTTATTTTATCATACC	R: GAGCTTGTATCTACTAGGATC	56	142-157, (CAT) ₅	Wadud <i>et al.</i> (2006b)
	<i>La171</i>	F: CGCTCAAACTGCACCAAC	R: TGTTCCCTAATCAACATACCC	56	264-297, (GAG) ₇ (GAG) ₃ (TG) ₃	Roy <i>et al.</i> (2008)
	<i>Jl1195M13</i>	F: TCTGAAAAGTGGCTGGCAGT	R: GTCTTTACCCTCCCCACAT	62	151-218, (AGTCC) ₆	This study, GQ483297-483298
	<i>Jl1209M5</i>	F: TCTTTACCATCCCCACGTA	R: GGACTGGGACTGGACTCAGA	60	107-152, (GAG) ₈	This study, GQ483299-483300
	<i>Lv257</i>	F: CAATGGACACGCCAACAAC	R: GTCCATTGGCATCGTTGA	57	228-252, (GCA) ₅	This study, GQ438301-483302
Nuclear rDNA	IGS	IGA: CATTTTGACTTGCSATTGAGG	5SA: CAGAGTCCTATGGCCGTGGAT	55	237-309	Roy <i>et al.</i> (2008)
	ITS	ITS1F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC	52	635	Gardes & Bruns 1993
Nuclear genes	<i>NAR</i>	NAR_bicL1: CTTCTGTTGGTGCTTTTGG	NAR_bicR: CCATAAAATCTTCAGTTGCATC	54	550	This study
	<i>G6PD</i>	G6pd_bicL: CTTTCGAGGAACTTAACAAG	G6pd_bicR2: AGATGAAAAGGTGATGTCAT	52	510	This study
Mitochondrial genes	<i>LrRNA</i>	ML5: CTCGGCAAATTATCCTCATAAG	ML6: CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC	52	410	White <i>et al.</i> 1990
	<i>SrRNA</i>	MS1: CAGCAGTCAAGAATATTAGTCAATG	MS4: AACCACCATTTCATCGTTGAC	50	480	White <i>et al.</i> 1990

(a) with nucleotidic motif under brackets for microsatellites. (b) with accession numbers of loci *Jl1195M13*, *Jl1209M5* and *Lv257* in Genbank.

Table S1 Portability to *L. amethystina* of microsatellite markers derived from the *L. bicolor* H82 genome (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>)

Amplification from		Single	Expected		Number of loci
<i>L. bicolor</i>	<i>L. amethystina</i>	band	product size ^a	Polymorphism ^b	
no ^c	-	-	-	-	405
yes	no	-	-	-	10, non portable to <i>L. amethystina</i>
yes	yes	no	-	-	47
yes	yes	yes	no	-	168
yes	yes	yes	yes	No	8
yes	yes	yes	yes	Yes	3, available for this study
Total:					638 loci tested

(a) expected product size compared to that of the locus on the sequenced genome

(b) polymorphism tested on a subset of 32 DNAs of European *L. amethystina*

(c) no amplification: multiple bands at all T_m, or unexpected product size

Table 3 Allelic richnesses, genotypic diversity, expected and observed heterozygosities and inbreeding within the 16 European and the Japanese populations

Population	N^c	Allelic richness of loci ^a										Heterozygosities		F_{IS} based on		s^e <i>modo</i> David	s^f based on F_{IS}	
		IGS	<i>Jl1195M13</i>	<i>Jl1209M5</i>	<i>La03</i>	<i>La17</i>	<i>La23</i>	<i>La171</i>	<i>Ll35</i>	<i>Lv257</i>	Total	H_e^d	H_o^d	9 loci	4 loci	<i>et al.</i> (2007)	9 loci	4 loci
Sco	41 (40)	4	4	3	1	3	3	9	3	3	29	0.33	0.46	0.28	0.04	0.04	0.44	0.08
Eng	40 (40)	4	5	3	2	4	4	10	2	2	32	0.27	0.43	0.38	0.15	0.19	0.55	0.26
Sp	38 (38)	7 (1)	4 (1)	3	1	3	3	10	2	3	36 (2)	0.33	0.47	0.29	-0.05	0.02	0.45	-
FrB	26 (22)	5	3	3	3	4	3	7	3	2	28	0.26	0.48	0.47	0.21	0.02	0.64	0.35
Bel	46 (46)	7 (2)	6 (1)	3	2	4 (1)	3	9	2	2	38 (4)	0.35	0.47	0.27	-0.08	0.18	0.42	-
FrO	32 (32)	3	4 (1)	3	2	4	3	8	3 (1)	2	32 (2)	0.24	0.47	0.49	-0.04	0.01	0.66	-
FrL	40 (40)	5	3	4	3	5 (1)	4 (1)	9	2	2	37 (2)	0.30	0.44	0.33	0.16	0.02	0.49	0.28
CH	43 (42)	4	3	3	2	3	3	8	2	3	27	0.27	0.41	0.34	0.09	0.02	0.51	0.17
GeF	36 (36)	4	3	5 (1)	2	3	3 (1)	8	2	2	32 (2)	0.29	0.41	0.29	0.09	0.20	0.45	0.16
GeGS	44 (44)	5	3	3	2	3	3	7	2	2	25	0.32	0.43	0.25	0.03	0.06	0.41	0.05
Aus	15 (15)	2	3	2	2	3	4	7	3	2	26	0.27	0.39	0.33	0.32	0.02	0.49	0.49
Pol	39 (39)	5	3	4	2	4	3	11	2	2	31	0.32	0.45	0.29	0.08	0.10	0.46	0.15
Den	37 (37)	5	3	3	2	3	3	9	3 (1)	3	34 (1)	0.31	0.41	0.26	0.08	0.07	0.41	0.16
Swe	41 (41)	4	5 (1)	2	2	3	3	10	2	3	34 (1)	0.34	0.41	0.18	-0.09	0.02	0.31	-
Fin	32 (31)	5	2	2	2	3	3	6	1	2	21	0.33	0.42	0.21	0.10	0.01	0.35	0.19
Est	37 (35)	4	2	2	1	3	3	10	2	3	26	0.25	0.36	0.29	0.02	0.27	0.45	0.04
Europe	587 (570)	9 (3)	10 (4)	6 (1)	3	6 (2)	7 (2)	12	5 (2)	4	62 (14)	0.29	0.43	0.31	0.07	0.08	0.47	0.20
Japan	36 (36)	3	10 (4)	4	1	5 (5)	4 (1)	6 (1)	3 (2)	1	37 (13)	0.44	0.44	-0.03	-0.06	0.04	-	-
Frequent alleles ^b	in Europe	2	2	3	2	3	2	8	2	2	26							
	in Japan	2	5	4	1	5	2	2	2	1	24							

(a) between brackets, number of private alleles within the population; (b) number of frequent alleles ($f > 0.05$); (c) between brackets, number of distinct genotypes; (d) H_e , H_o are respectively the expected and observed heterozygosities within populations. All H_o differ very significantly from H_e ($P < 0.000$, except for population Au: $P=0.002$).

Selfing rates s were calculated either (e) with no sensitivity to null alleles with RMES (David *et al.* 2007) or (f) based on $F_{IS} = s/(2-s)$, with the whole markers set (9 loci) or with the subset (loci IGS, *La03*, *La23*, *Lv257*).

Table 4 Genetic differentiation between pairs of populations. Upper diagonal, F_{ST} calculated with 9 loci; lower diagonal, in grey, F_{ST} calculated with 4 loci supporting Hardy-Weinberg equilibrium; in bold, F_{ST} values above 0.10.

Population	Sco	Eng	Sp	FrB	Bel	FrO	FrL	CH	GeF	GeGS	Aus	Pol	Den	Swe	Fin	Est	Jap
Sco	-	0.024	0.057	0.053	0.032	0.040	0.054	0.063	0.100	0.066	0.071	0.055	0.054	0.047	0.117	0.085	0.430
Eng	0.032	-	0.014	0.063	0.001	0.019	0.015	0.026	0.046	0.036	0.027	0.029	0.020	0.009	0.077	0.029	0.430
Sp	0.070	0.006	-	0.041	0.002	0.033	0.027	0.041	0.033	0.061	0.034	0.024	0.028	0.031	0.065	0.046	0.416
FrB	0.043	0.039	0.077	-	0.039	0.039	0.060	0.054	0.078	0.100	0.060	0.025	0.043	0.053	0.134	0.110	0.400
Bel	0.030	0.007	0.003	0.041	-	0.029	0.020	0.030	0.041	0.053	0.032	0.019	0.009	0.022	0.063	0.047	0.399
FrO	0.051	0.013	0.043	-0.006	0.022	-	0.024	0.017	0.039	0.035	0.019	0.007	0.030	0.017	0.111	0.040	0.402
FrL	0.030	0.007	0.003	0.033	-0.009	0.016	-	0.006	0.011	0.049	0.034	0.021	0.013	0.020	0.039	0.037	0.400
CH	0.034	0.001	0.020	0.006	0.003	-0.006	-0.002	-	0.013	0.068	0.003	0.006	0.010	0.015	0.070	0.024	0.428
GeF	0.104	0.024	0.010	0.075	0.021	0.041	0.018	0.025	-	0.058	0.013	0.018	0.034	0.030	0.041	0.019	0.412
GeGS	0.117	0.039	0.033	0.053	0.045	0.020	0.038	0.026	0.010	-	0.057	0.054	0.079	0.027	0.094	0.065	0.423
Aus	0.089	0.013	0.020	0.032	0.017	0.009	0.012	0.003	-0.015	-0.006	-	0.005	0.030	0.019	0.083	0.010	0.417
Pol	0.061	0.033	0.046	0.001	0.029	0.003	0.025	0.006	0.027	0.022	-0.002	-	0.009	0.020	0.079	0.036	0.401
Den	0.013	0.006	0.026	0.005	0.003	0.004	-0.001	-0.006	0.041	0.048	0.026	0.009	-	0.017	0.076	0.037	0.432
Swe	0.070	0.011	0.027	0.024	0.024	-0.002	0.016	0.005	0.039	0.013	0.018	0.027	0.020	-	0.084	0.019	0.448
Fin	0.135	0.082	0.044	0.174	0.057	0.146	0.054	0.102	0.050	0.118	0.077	0.118	0.102	0.138	-	0.079	0.393
Est	0.072	0.001	0.001	0.053	0.003	0.022	0.003	0.006	-0.005	0.018	-0.010	0.022	0.021	0.022	0.060	-	0.466
Jap	0.557	0.535	0.542	0.558	0.497	0.555	0.492	0.513	0.511	0.535	0.541	0.519	0.524	0.563	0.489	0.530	-



Fig. 1 Sampling sites in Europe cover a maximal distance of 2900 km, from Spain (3) to Finland (15). (1), Kirkhill, Scotland; (2), Newton Common, England; (3), Guipuscoa, Spain; (4), Bellême, France; (5), Boisfort, Belgium; (6), Orry-la-Ville, France; (7), Lyon, France; (8), Eschenbach, Switzerland; (9), Freising, Germany; (10), Gut Sunder, Germany; (11), Rotwald, Austria; (12), Łopuchówka, Poland; (13), Østerild, Denmark; (14), Olofström, Sweden; (15), Ruissalo, Finland; (16), Järvselja, Estonia.

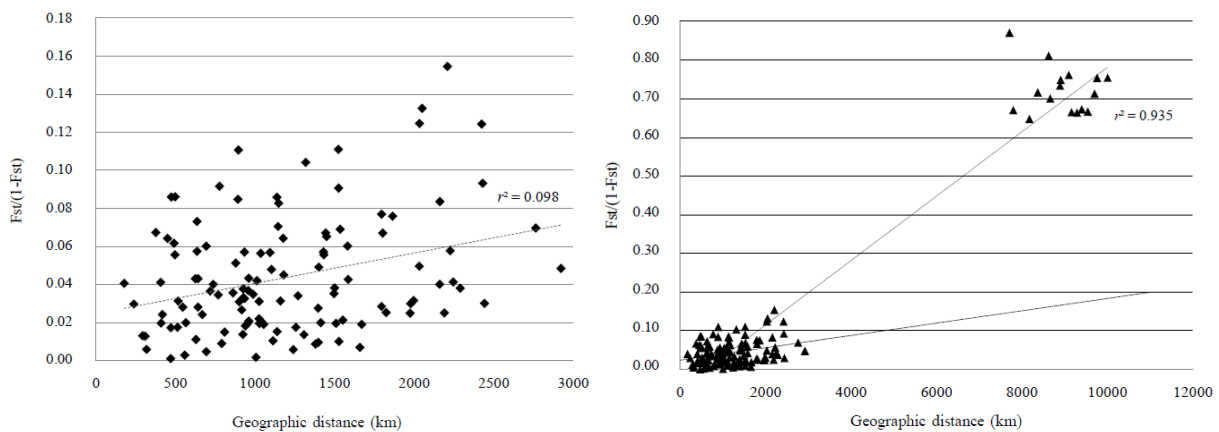


Fig. 2 Mantel tests showing correlation between genetic and geographic Euclidian distances d (in km) for *L. amethystina* populations. In Europe (a), $F_{ST}/(1 - F_{ST}) = 0.03d + 1.59 \times 10^{-5}$. For European plus

Japanese populations (b), $F_{ST}/(1 - F_{ST}) = 0.02 d + 7.12 \times 10^{-6}$; dashed line: extrapolation of the regression line for European populations to the Eurasiatic scale.

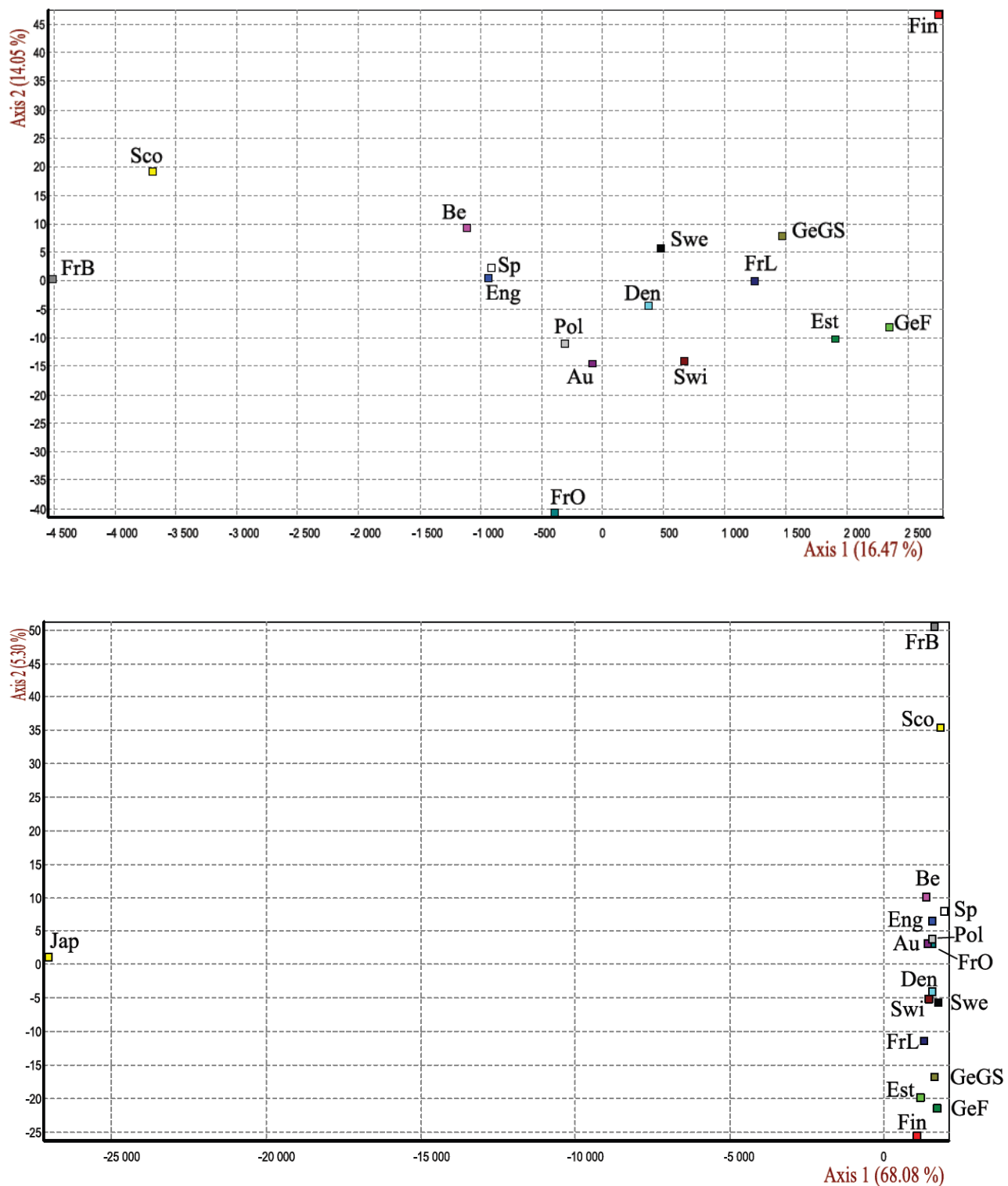


Fig. 3 Tri-dimensional Correspondence Factorial Analyses (CFA) on European and Japanese populations. For European populations (a), the two mains axis of the CFA only explained 16.5% and

14.5% of the variation, respectively; for European plus Japanese populations (*b*), the two main axis of the CFA only explained 68.1% and 5.3% of the variation, respectively.

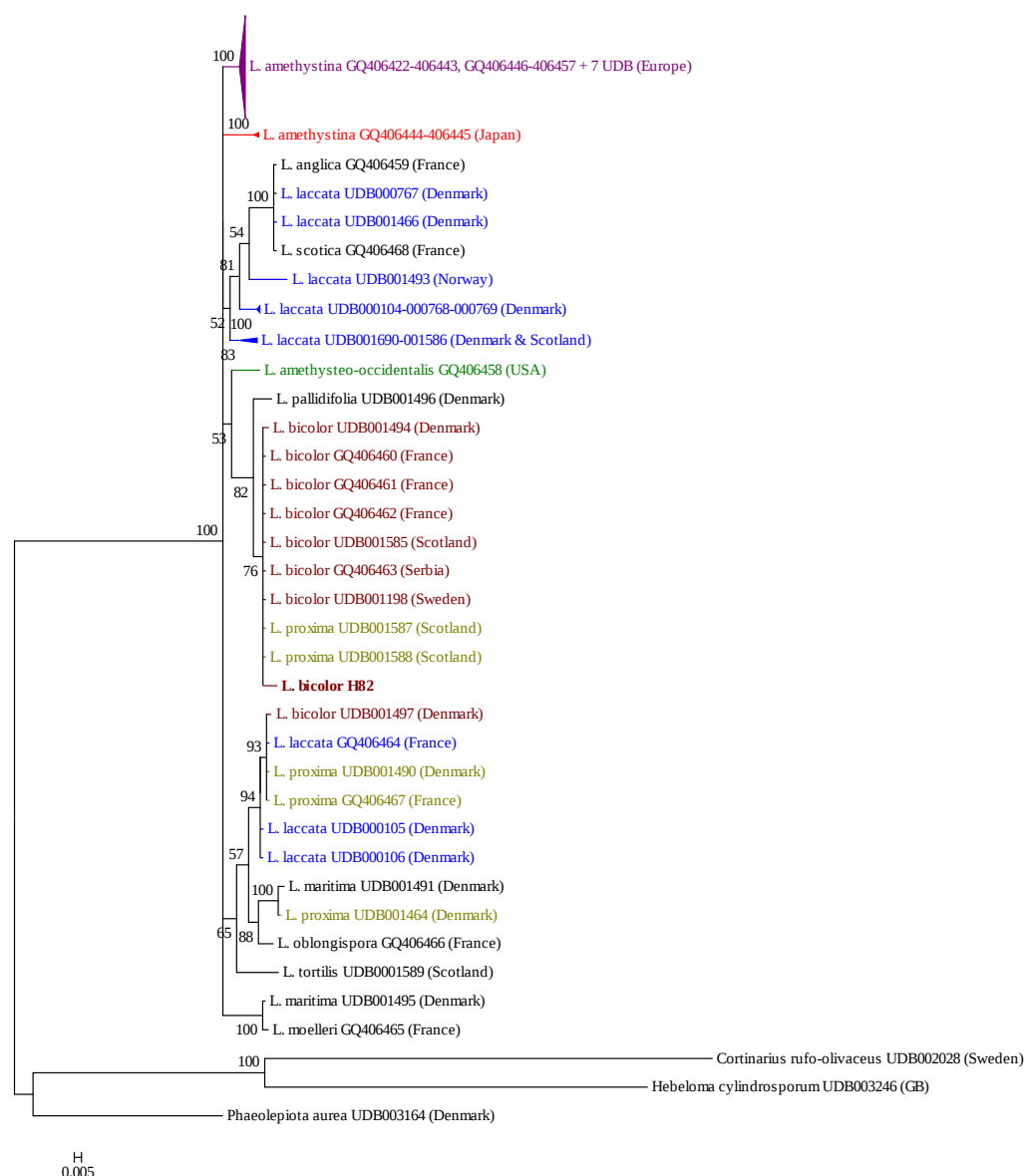


Fig. 4: Bayesian phylogram of *Laccaria amethystina* in Europe and Japan based on ITS (66 taxa, 635 characters; gaps were encoded in a matrix of indels). The best-fit nucleotidic evolutionary model was GTR+I ($I=0.52$). Dashed lines represent subtrees with support values <0.97 . Sequences GQ406422 to GQ406468 have been produced for this study, others are from Unite (labeled UDB) and genome of *L. bicolor* H82, with *Hebeloma cylindrosporum* (UDB003246), *Cortinarius rufo-olivaceus* (UDB002028) and *Phaeolepiota aurea* (UDB003164) as outgroups. '*L. amethystina* (Europe)' consists of 36 new sequences from France, Germany, Austria, Belgium, Belarus, Switzerland, Denmark, Spain, Estonia, Finland, Poland, Sweden, UK and Ukraine (GQ406422-GQ406443 and GQ406446-GQ406458), plus 7 sequences from Unite (UDB002418 and 000158 from Scotland, UDB001687, 001492, 000039, 000019 and 000006 from Denmark). '*L. amethystina* (Japan)' includes 2 Japanese sequences (GQ406444 and GQ406445).

Group '*L. bicolor* (Europe & USA)' consists of sequences of 3 French plus 1 Serbian sequence, and the sequence from the American strain H82 (<http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>).

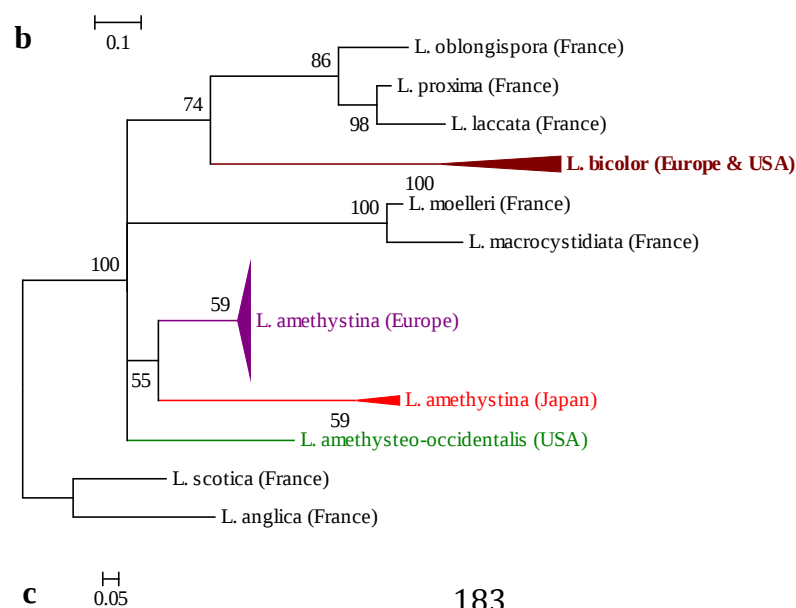
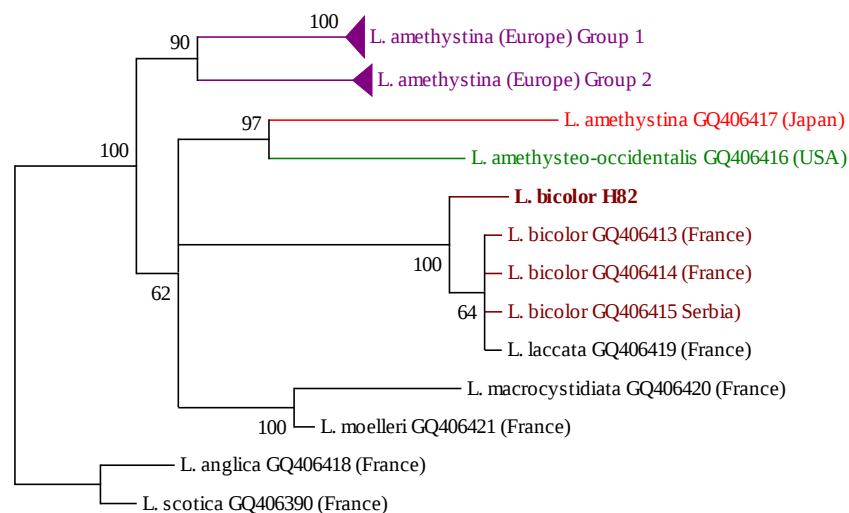
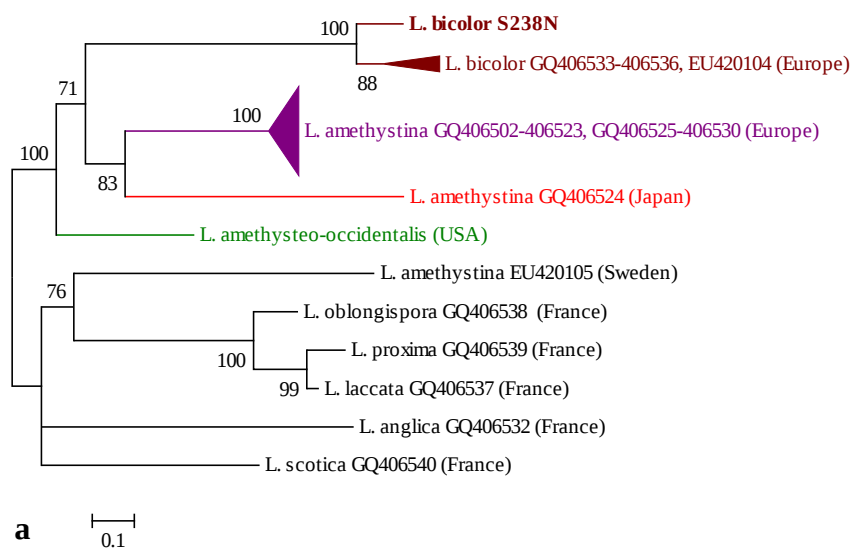
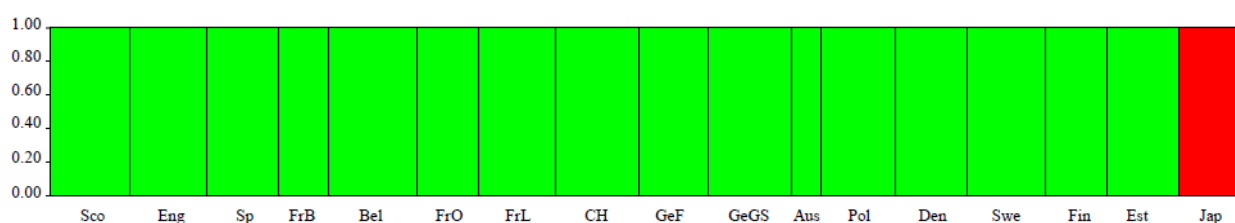


Fig. 5 Unrooted Bayesian phylograms of European and Japanese *L. amethystina* for nuclear genes. Dashed lines represent subtrees with support values <0.97. Sequences with no indication of origin were generated in this study; H82 is the genomic sequence available at <http://genome.jgi-psf.org/Lacbi1/Lacbi1.home.html>.

(a) Phylogram based on locus *NAR* (42 taxa, 560 characters.) The best-fit nucleotidic evolutionary model was HKY+ γ ($\alpha=0.36$). '*L. amethystina* (Europe)' consists of 28 new sequences from France, Germany, Austria, Belgium, Belarus, Switzerland, Denmark, Spain, Estonia, Finland, Poland, Sweden, UK and Ukraine. '*L. bicolor* (Europe)' consists of sequence EU420104 from Genbank and 4 new sequences from France and Serbia. EU 420105 is a sequence of *L. amethystina* from Genbank.

(b) Phylogram based on locus *G6PD* (34 taxa, 511 characters). The best-fit nucleotidic evolutionary model was K80+ γ ($\alpha=0.31$). '*L. amethystina* (Europe) Group1' consists of sequences of 13 sequences from Belgium, Denmark, Estonia, England, Germany, Poland, Spain, Sweden and Ukraine (GQ406393, GQ406395, GQ406412, GQ406398, GQ406399, GQ406400, GQ406402, GQ406403, GQ406046, GQ406408 and GQ406411, respectively). '*L. amethystina* (Europe) Group2' consists of 10 sequences from Austria, Belgium, Belarus, Switzerland, France, Germany, Poland, England and Spain (GQ406391, GQ406392, GQ406394, GQ406389, GQ406410, GQ406397, GQ406401, GQ406404, GQ406399 and GQ406407, respectively).

(c) Phylogram based on the supematrix cumulating the loci ITS, *NAR* and *G6PD* (44 taxa, 1706 characters). The best-fit nucleotidic evolutionary model was HKY+I+ γ ($I=0.74$; $\alpha=1.37$). Group '*L. bicolor*' consists of 5 sequences of *L. bicolor* (3 from France, 1 from Serbia, and 1 from strain H82). Group '*L. amethystina* (Europe)' consists of new sequences of 28 samples from France, Germany, Austria, Belgium, Belarus, Switzerland, Denmark, Spain, Estonia, Finland, Poland, Sweden, UK and Ukraine.



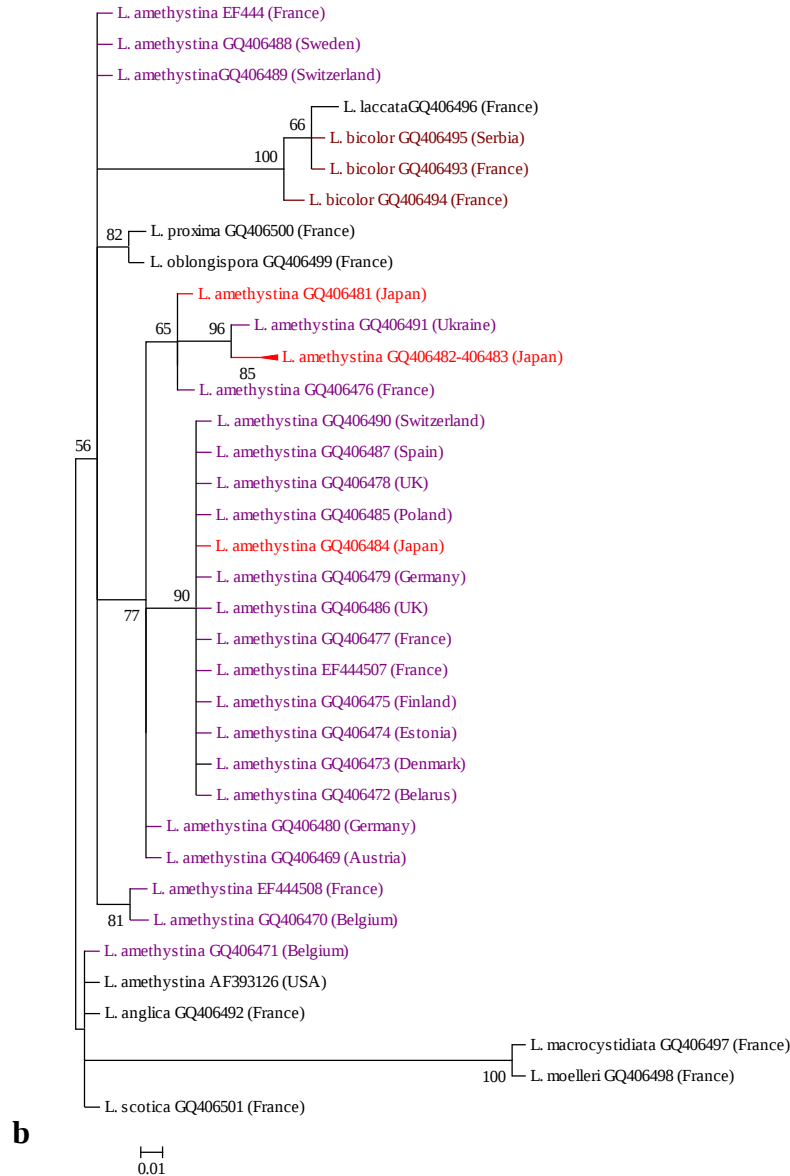
Sup. Fig. S1 Structure diagram of European and Japanese populations, for an *a priori* number of clusters $K=2$. On the abscissa are represented all the 623 individuals, organized following their geographic

origin (labels); on the ordinate, estimated membership coefficients for each individual in each cluster, each color corresponding to a cluster.



Sup. Fig. S2 Bayesian phylogram of *Laccaria* spp. using ITS sequences from this study as well as from Unite and Genbank (138 taxa, 622 characters). The best-fit nucleotidic evolutionary model was GTR+I+ γ ($I=0.81$; $\alpha=0.80$). Dashed lines represent subtrees with support values <0.97 . Sequences GQ406422 to GQ406468 have been produced in this study; UDB accessions are from Unite database, and labels EU, DQ, AY, AB, AF and EF are accessions from GenBank. Outgroups are Unite sequences from *Hebeloma cylindrosporum* (UDB003246), *Cortinarius rufo-olivaceus* (UDB002028) and *Phaeolepiota aurea* (UDB003164). '*L. amethystina* (Europe)' consists of 35 new sequences from France, Germany, Austria, Belgium, Belarus, Switzerland, Denmark, Spain, Estonia, Finland, Poland, Sweden, UK and Ukraine (GQ406422-GQ406443 and GQ406446-GQ406458) plus 7 sequences from Unite (UDB00158, 002418, 000006, 000019, 001492, 001687) as well as 6 sequences from GenBank (AF440665, EU076450 to EU076454).

Sup. Fig. S3 Partial alignment of ITS sequences of *L. amethystina* and *L. amethysteo-occidentalis*. Ame, *L. amethystina*; AmO, *L. amethysteo-occidentalis*; -, deletion. Position 0 is the 5' 13th base of primer ITS1F. Sequences labeled GQ have been produced for this study; UDB sequences are from Unite; the other ones are from Genbank.



Sup. Fig. S5 Unrooted Bayesian phylograms of *L. amethystina* in Europe and Japan for 2 mitochondrial ribosomal genes. Dashed lines represent subtrees with support values < 0.97. Whenever no indication of origin is given, sequences have been generated for this study. (a) Phylogram based on *SrRNA* (30 taxa, 477 characters). The best-fit nucleotidic evolutionary model was HKY+I ($I=0.81$). Sequences AF287824 and AF287825 are from GenBank. (b) Phylogram based on *LrRNA* (37 taxa, 410 characters). The best-fit nucleotidic evolutionary model was HKY+I ($I=0.88$). Sequences EF444506, EF444508 and AF393126 are from GenBank.

CHAPITRE IV

Discussion générale et perspectives

IV.1. Structure des populations de *Laccaria amethystina* et variabilité environnementale

Les espèces mycorhiziennes ont un rôle majeur dans l'écologie des forêts partout dans le monde (Smith et Read 2009). Certains taxa ont une aire de répartition très large, s'étendant sur plusieurs continents, voire dans les deux hémisphères comme *Ganoderma aplanatum* (Moncalvo et Buchanan 2008), *Tylopilus balloui* (Halling *et al.* 2008), ou *Amanita muscaria* (Geml *et al.* 2008). Les habitats occupés par ces champignons ectomycorhiziens cosmopolites sont extrêmement variables dans leurs espèces d'arbres, leur maturité, leurs conditions édaphiques ou encore climatiques. Ces variables influent potentiellement sur la dynamique et les stratégies locale et à plus grande échelle des populations de champignons mycorhiziens, et impliquent une grande adaptabilité de ces espèces à la variabilité environnementale ; ou bien le milieu participe à une spécialisation locale des populations, non visible à l'œil nu.

Cependant, au sein d'une même espèce présente dans des milieux variés, des adaptations locales sont couramment observées, à travers la variabilité phénotypique. Par exemple, l'altitude influe sur la taille des feuilles et leur réflectance chez *Verbascum thapsus* (Parker *et al.* 2003) ; ou bien le risque de dessiccation lié à la sécheresse environnementale accélère le développement et la métamorphose des larves de *Rana temporaria* (Laurila *et al.* 2002). Des adaptations locales peuvent aussi être suggérées par une structure génétique au sein des populations, comme une restriction des flux géniques entre populations chez *Zonotrichia capensis* (Cheviron et Brumfield 2009) ou une différenciation des populations de *Peromyscus maniculatus* (Storz et Kelly 2008) le long de gradients altitudinaux. Chez les champignons ectomycorhiziens, différentes études de populations présentent des exemples d'adaptation de la structure génétique et des stratégies écologiques de populations naturelles à des conditions environnementales locales, biotiques ou abiotiques :

- les perturbations du milieu peuvent influencer sur les tailles des génets et la stratégie écologique de populations ectomycorhiziennes : chez *Suillus grevillei* sous *Larix kaempferi* (perturbations anthropiques et animales ; Zhou *et al.* 2000), *Hebeloma cylindrosporum* (perturbations anthropiques du sol ; Guidot *et al.* 2003), ou *Tricholoma scalpturatum* et *T. populinum* (inondations d'un lit de rivière ;

Gryta *et al.* 2006), la vitesse de renouvellement des génets s'accroît en milieux perturbés ; les génets sont plus petits, et de stratégie rudérale

- les conditions édaphiques : chez *Cenococcum geophilum*, la texture et la structure des sols notamment sont liés à une structure génétique spatiale des populations (Jany *et al.* 2002)
- la maturité des hôtes : chez *T. matsutake* dans le Yunnan, les populations présentes dans des forêts de 50 ans ou des forêts « vieilles » se différencient génétiquement (Amend *et al.* 2009)
- la compétition avec les communautés locales ectomycorhiziennes ou les congénères : chez *L. duriusculum* (Selosse 2003).

Inversement, quelques études recherchant une adaptation locale dans les populations ectomycorhiziennes naturelles ont montré une absence de différenciation liée aux conditions environnementales testées. Chez *Suillus luteus*, Muller *et al.* (2004, 2007 ; Chapitre III) ont montré le faible effet de la pollution des sols sur la structure génétique des populations. La plupart des espèces ectomycorhiziennes sont considérées comme généralistes vis-à-vis de leurs hôtes (Smith et Read 2009). Pourtant, l'adaptation des populations ectomycorhiziennes naturelles à de multiples espèces d'arbres a peu été explorée jusqu'à récemment (Smith *et al.* 2009). Bergemann et Miller (2002), s'intéressant à la différenciation de populations de *Russula brevipes* sur 1500 km, ont conclu que les hôtes (*Pinus contorta* et *Picea sitchensis*) avaient moins d'effet sur la structure des populations que la distance géographique. De manière comparable, chez *T. matsutake*, parmi 17 populations chinoises (collectées soit dans des forêts mixtes dominées par *Pinus* sp., *Quercus* sp. et des arbustes, soit dans des pinèdes), Xu *et al.* (2008) ont montré une différenciation génétique entre des populations associées à des hôtes différents trois fois moindre à celle liée à la distance géographique entre les populations. En revanche, *Strobilomyces* spp., supposés généralistes avec des hôtes variés (conifères et feuillus), apparaissant comme uniquement associés à des Fabacées lors du séquençage des hôtes de leurs mycorhizes (Sato *et al.* 2007)

IV.1.1. Adaptations des populations de *L. amethystina* aux variations environnementales

Dans les populations de *L. amethystina*, les fortes variabilités génotypiques observées aux échelles locales (Gherbi *et al.* 1999 ; Fiore-Donno et Martin 2001 ; Wadud 2007) ont suggéré l'existence d'adaptations locales aux conditions environnementales, invisibles morphologiquement mais créant une structure génétique des populations. Nous avons testé l'influence de l'espèce hôte sur la différenciation génétique entre les populations de *L. amethystina*, et montré que cette espèce serait effectivement généraliste (Roy *et al.* 2008). En effet, la différenciation génétique entre des populations d'une même forêt, associées à des hôtes différents, était encore moins marquée ($F_{ST} = 0,01$) qu'entre des populations sous hôtes semblables mais distantes de 120 à 450 km ($F_{ST} = 0,02$). Cette absence de spécificité des populations à l'hôte pose cependant la question de l'effet de la maturité des génets dans leur stade forestier : des populations vieillissantes pourraient être plus soumises à la sélection (Petit et Hampe 2006).

Nous avons ensuite montré l'absence de différenciation des populations de *L. amethystina* par la distance géographique à l'échelle européenne (Vincenot *et al.* en préparation). Grâce à la variabilité environnementale des populations échantillonnées pour cette étude, nous avons pu tester l'effet de différents facteurs environnementaux sur une potentielle structure génétique des populations en Europe. Les tests de Mantel montrent, comme pour la France, une absence de corrélation entre la distance génétique entre les populations et l'âge de leur peuplement hôte ($r^2 = 0,13$; $p = 0,08$). Les populations européennes de *L. amethystina* ne semblent pas non plus structurées par des facteurs climatiques (températures moyennes annuelles : $r^2 = 0,01$ et $p = 0,25$; précipitations annuelles : $r^2 = 0,02$ et $p = 0,71$), ni géographiques (latitude : $r^2 = 0,05$ et $p = 0,07$; altitude : $r^2 = 0,02$ et $p = 0,84$). Comme nous le mentionnons dans notre étude (Vincenot *et al.* en préparation), le vrai généralisme d'association de *L. amethystina* à ses hôtes (espèces et âge de peuplement) et l'absence de différenciation des populations par les conditions climatiques et les variations géographiques de leurs habitats pourraient être impliqués dans l'efficacité de la dispersion des spores à longue distance. Les forêts tempérées européennes peuvent en effet être considérées, avec une telle adaptation aux milieux variés, comme un habitat continu où les spores de *L. amethystina* peuvent coloniser leur milieu d'arrivée et s'associer aux espèces hôtes locales. L'adaptabilité de *L. amethystina* à des conditions environnementales diverses pourrait cependant parfois être un désavantage pour

cette espèce, présente partout mais répartie parcimonieusement, visible en taches de fructifications regroupées, dans les forêts. En effet, dans un milieu où sont présents des champignons ectomycorhiziens spécialistes, *L. amethystina* pourrait subir les effets de la compétition et ne pas s'établir et fructifier aussi efficacement que ces autres espèces.

IV.1.2. Des adaptations locales « invisibles » par les marqueurs neutres ?

Cependant, même si à une échelle de plusieurs centaines de kilomètres, nous n'avons pas détecté de structure génétique des populations liée à la variabilité environnementale à ce niveau, il pourrait exister des variations locales au sein des populations, non détectées par les marqueurs neutres que nous avons utilisés. Comme le soulignent Gryta *et al.* (2006), les ressources sur un même site peuvent être hétérogènes, et Hoeksema et Thompson (2007) ont révélé, expérimentalement, des adaptations locales de *Rhizopogon* sp. à des ensembles de conditions environnementales contrôlées. Au niveau intra-site, une mosaïque de facteurs locaux, insoupçonnés ou non quantifiés, pourrait effectivement exister localement et être liée à des adaptations locales des populations de *L. amethystina*. Par exemple, la présence de bois mort observée sur la placette 2 de suivi au Col de Faubel semble faciliter la fructification de certains génets, et peut-être leur persistance (un des 2 génets persistants de 2007 à 2008 se situe au niveau de débris de bois accumulés au sol).

À un niveau plus large, dans les études française (Roy *et al.* 2008) et européenne (Vincenot *et al.* en préparation) des populations de *L. amethystina*, quelques-unes paraissent « aberrantes », et se distinguent génétiquement des autres sans que nous en comprenions les raisons (population de Bellême sous *Fagus sylvatica*, et population finlandaise). Ces différenciations pourraient correspondre à une histoire inconnue des populations, mais aussi être liées à une variation environnementale non détectée par des marqueurs moléculaires neutres. En effet, l'association de la recombinaison et de la sélection à chaque génération pourrait « effacer » régulièrement les signaux de structure génétique spatiale. Un moyen de déceler des adaptations locales des populations de *L. amethystina* aux conditions environnementales serait de recourir à des marqueurs sous sélection pour décrire la variabilité au sein des populations. Par exemple, en ciblant des SNP de gènes (choisis dans le génome de *L. bicolor*) soumis à une sélection balancée (*e.g.* des gènes de type sexuel) ou une sélection directionnelle

(potentiellement, des gènes impliqués dans l'association mycorhizienne), il pourrait être possible de détecter des traces de sélection locale par des facteurs du milieu, invisibles par des marqueurs neutres. Si des indices de sélection locale sur ces gènes étaient repérés, cette adaptation pourrait éventuellement par la suite être quantifiée en suivant l'expression de ces gènes au cours du vieillissement des génets (Courty *et al.* 2006).

IV.1.3. Adaptations des populations et flux géniques

L'adaptation observée de *L. amethystina* à des conditions environnementales variables pourrait relayer la dispersion des spores à très grande distance et faciliter leur établissement. Et *vice versa*, les flux géniques à grande échelle participent au maintien du polymorphisme au sein des différentes populations, et contrevenir à la sélection locale (Lenormand 2002). Cette balance entre flux de gènes et sélection locale (si elle existe), potentiellement liée aux variations du milieu, limiterait l'adaptation des populations à des conditions environnementales précises et préserveraient les capacités généralistes de *L. amethystina*. Cette importance de la reproduction sexuée et des flux de gènes entre populations, permettant l'évolution des populations et le maintien de la diversité génétique intra-populations avait été mentionnée par exemple par Muller *et al.* (2007), concernant les populations de *S. luteus* soumises à des conditions édaphiques contrastées. Chez *L. amethystina*, les flux géniques au sein de la population globale en Europe pourraient homogénéiser la diversité des populations, et limiter les adaptations locales aux variations environnementales hétérogènes des forêts tempérées européenne.

IV.2. *Laccaria amethystina*, une espèce eurasiatique ou une spéciation cryptique entre Europe et Asie ?

IV.2.1. Délimitation des espèces fongiques

La plupart des espèces fongiques ont d'abord été décrites en regard du concept d'espèce morphologique, sur des critères taxonomiques visuels tels que les morphologies macro- et

microscopique des structures de reproduction, voire des appareils végétatifs (Hawksworth *et al.* 1995). Par la suite, de nombreuses **espèces cryptiques** ou complexes d'espèces ont été identifiés au sein de ces taxons, à travers des critères fonctionnels (infectivité, métabolisme, résistances) mais surtout par les incompatibilités sexuelles, révélant des « *groupes de populations naturelles interfertiles effectivement ou potentiellement, isolées reproductivement d'autres groupes semblables* » (Mayr 1940), c'est-à-dire des **espèces biologiques** distinctes. Cependant, la reconnaissance des espèces biologiques n'est pas applicable à tous les taxons : certains champignons homothalliques sont capables de produire des méiospores sans jamais d'allofécondation. Inversement, des structures de reproduction sexuée n'ont jamais été observées pour 20% des espèces fongiques (Hawksworth *et al.* 1995), et beaucoup de champignons ne sont pas cultivables *in vitro*. Pour ces champignons, il est alors impossible de tester par ce moyen l'existence de différentes espèces biologiques. D'autre part, dans le cas d'espèces allopatriques de milieux disjoints, l'interfertilité en laboratoire peut persister, bien que les populations naturelles soient tout à fait isolées dans leur reproduction (Mayr 1940 ; Brasier 1987 pour les champignons). Les outils de phylogénie peuvent alors être un moyen puissant de reconnaissance des espèces, contournant les lacunes des critères taxonomiques morphologiques ou reproductifs. Après un événement de spéciation, les séquences géniques des nouvelles espèces divergent au cours du temps, et leurs changements peuvent souvent être détectés avant que des modifications ne soient apparentes dans leurs systèmes de reproduction ou leur morphologie (Cracraft 1983). Différentes études ont comparé les critères de reconnaissance biologique et phylogénétique des espèces chez les champignons. Par exemple, Dettmann *et al.* (2003) ont réalisé une phylogénie multi-locus (4 loci nucléaires) de *Neurospora* spp. Le critère de **reconnaissance phylogénétique des espèces** leur a permis d'identifier huit espèces, dont cinq correspondaient aux espèces décrites biologiquement. Cette étude montre la robustesse du critère phylogénétique par rapport à la reconnaissance biologique des espèces dans ce genre, révélant de nouveaux clades au sein d'espèces biologiques d'une part, et précise leurs relations phylogénétiques d'autre part. Aujourd'hui, le critère phylogénétique est très couramment utilisé pour définir les espèces, et révèle fréquemment des clades cryptiques au sein d'espèces décrites sur des critères biologiques ou morphologiques (Giraud *et al.* 2008 ; Vincenot *et al.* 2008 ; Hughes *et al.* 2007 ; James *et al.* 2006 ; 81 articles répertoriés au 15 octobre 2009 dans l'ISI Web of Knowledge traitent d'espèces cryptiques fongiques reconnues phylogénétiquement).

Chez les espèces ectomycorhiziennes, les premières phylogénies ont été réalisées sur un seul gène, généralement le locus nucléaire de l'ITS (*e.g.* Bidartondo et Bruns 2002 ; Selosse *et al.* 2002), ou un locus mitochondrial de sous-unité ribosomique (Bruns *et al.* 1998 ; Aanen *et al.* 2000). Mais ces phylogénies monogéniques ne permettent pas toujours de montrer l'existence d'espèces cryptiques, une généalogie déduite d'un seul locus ne reflétant pas forcément l'évolution générale d'un génome. D'autre part, si les marqueurs phylogénétiques choisis évoluent trop lentement, ils témoigneront des caractères ancestraux persistants (symplesiomorphie), mais permettront peu de différencier les nouvelles lignées. Les développements biotechnologiques, donnant le choix de marqueurs variés et permettant la production plus rapide et à moindre coûts de séquences nucléotidiques, ont permis par la suite la réalisation de phylogénies multi-locus de divers genres ectomycorhiziens, et révélé l'existence d'espèces cryptiques. Par exemple, Sato *et al.* (2007), à l'aide d'une phylogénie multi-locus (gènes nucléaires et mitochondriaux) ont montré l'existence de 14 lignées au sein de 4 espèces de *Strobilomyces* spp. décrites sur des critères morphologiques et biologiques, suggérant l'existence d'espèces cryptiques dans ce genre jusque-là considéré comme peu diversifié. De façon comparable, Hedh *et al.* 2008 ont exploré la diversité de l'espèce *Paxillus involutus*, dont la variabilité dans l'Hémisphère Nord et l'interstérilité entre différents groupes fait supposer l'existence d'un complexe d'espèces. Les auteurs ont réalisé une phylogénie de *P. involutus* basée sur 5 loci, avec laquelle ils ont identifié 4 espèces, dont 3 correspondaient à des espèces décrites.

IV.2.2. Hypothèse de spéciation cryptique transcontinentale chez *L. amethystina*

Différents indices biologiques et moléculaires, synthétisés dans notre étude (Vincenot *et al.* en préparation), suggéraient une différenciation entre les populations européennes et japonaise de *L. amethystina* (Tableau 8), comme le manque de transférabilité de marqueurs moléculaires mis au point pour l'espèce *L. amethystina* en Europe ou au Japon, et difficilement amplifiables chez des individus de l'autre population (Donges *et al.* 2008 ; Roy *et al.* 2008 ; Vincenot *et al.* en préparation).

Tableau 8 : Différences au sein de *L. amethystina* entre Europe et Asie

Critères	<i>L. amethystina</i> en Europe	<i>L. amethystina</i> au Japon (Mont Fuji)
Morphologie	Pas de différence macro- ou microscopique évidente (G. Mueller, communication personnelle)	
Écologie	Stratégie R / S, en forêts matures	Stratégie R, en succession primaire
Hôtes	Fagacées, Pinacées, Betulacées	<i>Salix reinii</i> (Salicacée)
Cultivabilité <i>in vitro</i>	Non réussie (D. Mousain, G. Mueller, MA. Selosse, communications personnelles)	Maîtrisée (K. Nara, communication personnelle)
Transférabilité de microsatellites	Pas d'amplification des loci <i>La07</i> , <i>La12</i> , <i>La14</i> (Donges <i>et al.</i> 2008 ; Roy <i>et al.</i> 2008 ; observations personnelles) publiés comme « spécifiques à <i>L. amethystina</i> » par Wadud (2006a) au Japon	60% de mésamplification du locus <i>La171</i> (Vincenot <i>et al.</i> en préparation), développé pour des populations françaises de <i>L. amethystina</i> (Roy <i>et al.</i> 2008)
Divergence moléculaire	Variation de l'ITS : 2,5% de divergence, 3 indels Deux clades monophylétiques : Europe et Japon, fortement soutenus (> 0,97)	

Une phylogénie préalable à notre étude, basée sur les séquences de l'ITS de *L. amethystina* d'Europe et du Japon déposées dans Genbank montrait déjà une variation de l'ITS entre ces deux groupes (2,5% de divergence nucléotidique sur 600 pb, 3 indels, contre 0,3% de variation au sein du clade européen). Cependant, comme l'a à nouveau montré le manque de résolution des phylogénies basées sur un seul locus dans notre étude (voir notamment les phylogénies mitochondriales ou la phylogénie générale de *Laccaria* spp. basée sur l'ITS), ces observations de divergence devaient être confirmées par une analyse moléculaire robuste, basée sur des marqueurs variés et reproductibles. Notre approche de génétique des populations (Vincenot *et al.* en préparation) a révélé une différenciation extrême ($F_{ST} = 0,43$) et un isolement par la distance hautement significatif entre la population globale européenne de *L. amethystina* et la population japonaise du Mont Fuji. L'analyse phylogénétique multilocus complémentaire confirme cette différenciation, sans la résoudre : les séquences des échantillons du Japon forment, de manière fortement soutenue, un clade distinct de celui, monophylétique, des séquences de *L. amethystina* d'Europe. L'ensemble de ces données met en évidence un isolement reproducteur par interruption des flux de gènes entre populations européennes et

japonaise de *L. amethystina*, soulevant l'hypothèse d'une **spéciation cryptique** de part et d'autre de l'aire de répartition de ce champignon ectomycorhizien. Des spéciations cryptiques ont été récemment détectées chez d'autres champignons ectomycorhiziens par une approche semblable, couplant génétique des populations et phylogénie, par exemple par Carriconde *et al.* (2008) chez *T. scalpturatum* ou par Sanon *et al.* (2009) chez *Scleroderma* spp.

L'absence d'échantillonnage intermédiaire entre l'Europe et le Japon ne nous permet pas de situer les barrières géographiques créant potentiellement un isolement reproducteur. Un moyen de tester l'existence de telles barrières serait d'utiliser le critère de reconnaissance biologique. Cependant, la culture *in vitro* de *L. amethystina* d'Europe n'est pas maîtrisée à présent. D'autre part, l'interfertilité au laboratoire de souches européennes et japonaises ne permettrait pas de rejeter complètement l'hypothèse de spéciation cryptique : l'**isolement reproducteur** observé entre les populations peut ne pas être post-zygotique (après la fécondation ; Orr et Coyne 1989), mais simplement pré-zygotique (avant fécondation ; Mayr 1940), dû à l'isolement entre les populations naturelles, prévenant la rencontre entre les gamètes des deux populations. Dans ce cas, une seule espèce biologique serait identifiée, la divergence génétique n'ayant pas (encore) affecté les capacités d'hybridation des espèces.

Une autre interrogation qui reste en suspens est celle des facteurs ayant pu causer la spéciation au sein des populations eurasiatiques de *L. amethystina*. Le fait que les deux espèces ne soient pas présentes en sympatrie sur la zone échantillonnée suggère une spéciation allopatrique. L'absence d'échantillonnage intermédiaire entre l'Europe et le Japon ne permet pas de placer une éventuelle barrière géographique au sein de l'aire de répartition, et laisse donc trois hypothèses possibles : (i) une spéciation parapatricque (en anneau), avec un continuum de populations interfertiles de proche en proche, mais isolées entre les extrémités de l'aire de distribution de l'espèce (*i.e.* entre l'Europe et le Japon) ; (ii) une spéciation péripatricque, avec franchissement d'une barrière géographique (par exemple un désert ou une mer) par des spores, colonisation d'un nouvel habitat favorable, et isolement par dérive génétique (effet fondateur); ou (iii) une spéciation vicariante, avec mise en place d'une barrière géographique (désertification...) au milieu de l'aire de répartition de l'espèce et évolution séparée des

populations de part et d'autre de la barrière. Cependant, malgré l'adaptabilité environnementale apparente des populations de *L. amethystina* à l'échelle européenne, l'hypothèse de parapatricie semble peu vraisemblable. En effet, notre échantillonnage européen était exempt de barrière géographique pouvant créer une discontinuité de milieu parmi les populations, et limiter la dispersion des spores de proche en proche ou à longue distance. Mais à l'échelle du continent eurasiatique, l'isolement des populations par la distance géographique peut encore être accentué par différentes barrières géographiques, telles que des chaînes montagneuses, des déserts ou des mers. Cette hypothèse de spéciation vicariante entre les populations d'Europe et du Japon semble plausible. Pour mieux comprendre l'événement de spéciation chez *L. amethystina* en Eurasie, un échantillonnage complémentaire sera nécessaire, afin (i) d'explorer la structure génétique des populations à l'échelle transcontinentale, et (ii) identifier les éventuelles barrières géographiques à la dispersion.

IV.3. Complémentarité des études de populations de *Laccaria amethystina*, du suivi local à l'échelle continentale

Comme évoqué en introduction de cette thèse, la biologie procède de différentes échelles imbriquées, du niveau infra-individuel à celui du groupe d'individus interagissant au sein des populations et des communautés d'espèces. Mes travaux de thèse, centrés sur les populations d'un champignon ectomycorhizien, se situent eux aussi à différents niveaux spatio-temporels, du suivi local et pluriannuel à l'étude des flux géniques à l'échelle transcontinentale de l'aire de répartition de *L. amethystina*. Chacun de ces niveaux d'études apporte des informations qui lui sont propres sur la biologie de l'espèce: les suivis locaux nous renseignent plus précisément sur le régime de reproduction, la dynamique spatio-temporelle des populations et l'effort reproducteur des individus, tandis que les études à plus grande échelle nous permettent d'estimer les capacités d'adaptation environnementale et de dispersion de *L. amethystina*. Les connaissances apportées par ces différents niveaux sont **complémentaires**, et nous ont permis de formuler des questions biologiques passant d'une échelle à l'autre (Tableau 9). Comment les régimes de reproduction des populations locales se complètent-ils dans l'ensemble des populations européennes? Comment des basidiospores, qui semblent dispersées

principalement à proximité des carpophores parents (Wadud 2007 ; notre étude au Col de Faubel), relaient-elles les échanges géniques entre des populations distantes de centaines de kilomètres (Vincenot *et al.*, en préparation) ? Des écologies variables en habitats contrastés (Gherbi *et al.* 1999 ; Fiore-Donno et Martin 2001 ; notre étude ; Nara *et al.* 2003 ; Wadud 2007) reflètent-elles une différenciation génétique des populations (Vincenot *et al.* en préparation ; Chapitre IV.1 et IV.2) ?

IV.3.1. Régimes de reproduction

Les suivis de populations de *L. amethystina* sur des placettes permettent de décrire précisément les régimes de reproduction locaux. L'allogamie semble prépondérante à cette échelle, avec presque pas d'autofécondation apparente (F_{IS} négatifs et taux estimés : s de 0,01 à 0,12), voire un excès d'hétérozygotes. Au sein de chaque population échantillonnée pour l'étude à l'échelle européenne, cette autofécondation semble plus élevée (F_{IS} de 0,18 à 0,49), alors que nous nous attendions à trouver le même excès d'hétérozygotes ou d'homozygotes à toutes les échelles. La discontinuité des fréquences en hétérozygotes à différentes échelles pourrait refléter un effet Wahlund, c'est-à-dire une structure génétique spatiale des populations. Cependant, nos résultats aux échelles française et européenne montrent l'absence d'une telle structure, avec de forts flux géniques entre populations sur 2900 km. Il pourrait alors s'agir d'un artefact d'estimation des fréquences H_e et H_o lié à l'échantillonnage restreint au Col de Faubel : chaque population cévenole compte entre 6 et 16 génotypes. Pour le moment, nous comprenons mieux les résultats intra-populations apportés par les échelles française et européenne.

Il est donc difficile de comparer des régimes de reproduction à des échelles aussi différentes, et les processus agissant localement pourraient être précisés par le suivi à long terme des populations du Col de Faubel. Aux échelles française et européenne, nous pouvons observer l'existence d'une **population européenne** panmictique (F_{IS} global : 0,31) grâce aux flux géniques entre les différentes populations échantillonnées de l'Espagne à la Finlande (Vincenot *et al.* en préparation). Ces flux semblent possibles (i) par la dispersion de spores de *L. amethystina* à longue distance (dispersion par les courants aériens, sans obstacle géographique sur des centaines de km), mais sans doute également par (ii) des événements de

dispersion et d'établissement des spores de proche en proche, relayés par l'adaptabilité de l'espèce à la diversité des milieux forestiers tempérés (Roy *et al.* 2008 ; Chapitre IV.2.). Ces flux géniques entre populations façonnent chaque population locale, influant sur ses processus évolutifs et sa dynamique en y renouvelant régulièrement la variabilité génétique (Lenormand 2002), et l'incluant dans un **continuum de populations** de taille beaucoup plus large. Il reste cependant difficile d'estimer la taille efficace de cette population globale européenne, la densité des populations sur cette surface étant inconnue.

IV.3.2. Flux géniques entre les populations et dispersion

Les tests de Mantel d'isolement par la distance à différentes échelles donnent les équations des droites de régression entre les distances génétiques et géographiques des différentes populations. Les tests aux échelles locale (suivi au Col de Faubel), française (Roy *et al.* 2008) et européenne (Vincenot *et al.* en préparation) n'étaient pas significatifs. La comparaison des pentes de régression, représentant les taux d'isolement par la distance entre les populations, présente aussi une discontinuité entre échelles.

À l'échelle française, la pente de la droite était négative, mais les analyses ont été réalisées avec un jeu de marqueurs différent des autres échelles, ce qui pourrait causer un artefact d'analyse. Entre les populations de Bellême et Orry, le F_{ST} était en effet de 0,07 dans l'étude en France (Roy *et al.* 2008), et de 0,04 dans l'étude européenne (Vincenot *et al.* en préparation). Il paraît alors uniquement possible de comparer les patrons d'isolement par la distance entre les études européenne (2900 km) et eurasiatique (10000 km), comme nous l'avons proposé dans Vincenot *et al.* (en préparation) : la rupture entre la pente d'isolement par la distance ($1,6 \cdot 10^{-5}$, non significatif) en Europe et en Eurasie ($8,3 \cdot 10^{-5}$, $p=0,004$) suggère que des processus différents opèrent à ces échelles. Nous avons mis en évidence un isolement reproducteur entre les populations européennes et japonaise, potentiellement lié à un phénomène de spéciation de *L. amethystina* sur cette distance.

Les études des populations de *L. amethystina* à des échelles successivement élargies ne nous ont pas permis de détecter une structure génétique spatiale en Europe, ni de barrière aux flux

géniques. Au contraire, elles ont révélé la capacité de dispersion à longue distance de *L. amethystina*, relayée par son adaptabilité environnementale, et l'existence de barrières reproductives de part et d'autre de son aire de répartition. Les études à différentes échelles apportent un ensemble de connaissances qui s'assemblent, composant une image un peu plus précise de la biologie et de l'écologie de cette espèce modèle dans ses habitats, et complétant la compréhension de sa biologie *in vivo*.

Tableau 9 : Apports complémentaires des différents niveaux d'étude sur les processus modelant les populations de *L. amethystina*

Processus évolutif	Échelle locale (80 m)	Échelle française (450 km)	Échelle européenne (2900 km)	Échelle eurasiatique (10000 km)
Études	Gherbi <i>et al</i> 1999 ; Fiore-Donno et Martin 2001 ; Wadud 2007 ; suivis au Col de Faubel	Roy <i>et al</i> 2008	Vincenot <i>et al.</i> en préparation	Vincenot <i>et al.</i> en préparation
Régime de reproduction	Reproduction sexuée (peu de déséquilibre de liaison) ; peu d'autofécondation apparente (F_{IS} négatifs) Régime d'allofécondation présent à plus grande échelle ?	Panmixie sur 450 km Dans les sous-populations, autofécondation (F_{IS} : 0,15 à 0,42) et peu de déséquilibre de liaison	Panmixie sur 2900 km Dans les sous-populations, autofécondation (F_{IS} : 0,18 à 0,49) et peu de déséquilibre de liaison	Isolement reproducteur entre Europe et Japon Dans la population japonaise, peu d'autofécondation ($F_{IS} < 0$), pas de déséquilibre de liaison
Dispersion	Autocorrélation limitée à 1,50 m (suivi au Col de Faubel), ou pas d'isolement sur 10 m (Fiore-Donno et Martin 2001) ; F_{ST} : 0,18 à 0,24 sur 80 m Quelle capacité de dispersion ?	Pas d'isolement par la distance sur 450 km ($r^2=0,01$; $p=0,63$) ; F_{ST} : 0,02 à 0,03 Capacité de dispersion à longue distance ?	Pas d'isolement par la distance sur 2900 km ($r^2=0,01$; $p=0,06$) ; F_{ST} : 0,001 à 0,134 Dispersion à longue distance	Isolement par la distance total sur 10000 km ($r^2=0,94$; $p=0,004$) ; F_{ST} : 0,43 Phénomène de spéciation ? (Chapitre IV.2)
Adaptation environnementale (Chapitre IV.1)	Forte diversité génétique locale Adaptations locales aux variations environnementales ?	Pas de différenciation des populations par les hôtes (espèce et âge)	Pas de différenciation des populations par l'environnement	Spéciation allopatrique par disjonction des habitats ?
Perspectives	Continuer le suivi sur plusieurs années	Chercher des traces d'adaptation par des marqueurs sélectionnés		Compléter l'échantillonnage

IV.4. Perspectives : poursuivre l'étude des populations de *Laccaria* sp. à des échelles complémentaires

Les études de la structure génétique des populations de *L. amethystina* mises en place au cours de ma thèse soulèvent diverses questions biologiques, et appellent à d'autres travaux, aux échelles locale et transcontinentale. Mes résultats ouvrent également la voie à l'étude des populations d'autres espèces de *Laccaria*, qui pourrait être facilitée par la disponibilité du génome de *L. bicolor* et des avancées biotechnologiques, par exemple le pyroséquençage d'autres espèces de laccaires.

IV. 4.1. Disponibilité de marqueurs moléculaires

Un des premiers objectifs de mes travaux de thèse a été le développement de marqueurs moléculaires fiables pour l'étude des populations de *L. amethystina*. Nous avons choisi d'utiliser des microsatellites, car ce sont des marqueurs neutres, codominants et reproductibles. Le développement de ces marqueurs sur la base du génome de *L. bicolor* a été peu efficace, vraisemblablement pour diverses raisons. Les plus évidentes sont (i) une transférabilité limitée des marqueurs d'une espèce à l'autre (ii) une structure génomique particulière, où les loci microsatellites semblent fréquemment dupliqués sur plusieurs chromosome (observation personnelle), et surtout (iii) une absence de polymorphisme pour de nombreux loci microsatellite testés. Ces difficultés rencontrées lors du développement de microsatellites ne sont cependant pas surprenantes, au regard de différentes études témoignant d'obstacles semblables, chez des champignons ectomycorhiziens (Adams *et al.* 2006 ; Amend *et al.* 2009), et chez diverses espèces fongiques en général (Dutech *et al.* 2007). Malgré ces obstacles, nous disposons actuellement d'un jeu de marqueurs neutres suffisamment résolutif pour poursuivre l'étude de la structure génétique des populations de *L. amethystina*. D'autre part, des marqueurs SNP sont en cours de développement, sur la base du génome de *L. bicolor*, à l'INRA de Champenoux. Le développement de ces marqueurs de polymorphisme nucléotidique permettrait de cibler des gènes potentiellement sous sélection directionnelle, comme les gènes impliqués dans l'interaction mycorhizienne, pour caractériser la structure génétique des populations en regard des conditions environnementales.

Pour notre approche phylogéographique, nous avons souhaité construire des phylogénies multilocus, basées sur des séquences nucléaires et mitochondriales, codantes ou non. Les marqueurs mitochondriaux des petite et grande sous-unité ribosomique (*LsRNA*, *SsRNA*) se sont révélés très peu polymorphes au sein du genre *Laccaria*, n'apportant aucune information de structure à nos phylogénies (Lynch *et al.* 2006). Ce manque d'informativité avait été noté par Bruns *et al.* (1998) : selon eux, « *cette région produit souvent des séquences identiques pour des espèces très proches, limitant l'intérêt de ce fragment conservé de l'ADN au niveau spécifique* ». La vitesse d'évolution des deux gènes nucléaires (*G6PD*, *NAR*) que nous avons choisis pour réaliser nos phylogénies était en revanche très limitée, les séquences nucléotidiques présentant des niveaux de polymorphisme nucléotidique plutôt faibles (la divergence entre taxa était toujours inférieure à 10%). Cependant, nos phylogénies multilocus basées sur l'ITS et ces deux gènes nucléaires ont montré un niveau de résolution spécifique et péri-spécifique suffisant pour distinguer la variabilité inter- et potentiellement intra-spécifique chez les laccaires, et ce jeu de marqueurs pourra être utilisé pour d'autres approches phylogénétiques du genre. Notre association des deux approches complémentaires de phylogénie et de génétique des populations nous a permis de préciser le niveau de polymorphisme de la population européenne, peu accessible par des marqueurs phylogénétiques, à l'aide de microsatellites, et de compléter notre approche phylogéographique. Pour la réalisation de futures phylogéographies au sein du genre *Laccaria*, il sera possible d'utiliser nos jeux de marqueurs, à compléter par d'autres marqueurs neutres pour l'étude des flux géniques entre populations et d'autres loci pour préciser les phylogénies, à développer sur la base de ressources génomiques.

IV.4.2. Prolonger les suivis spatio-temporels locaux

Deux placettes permanentes de suivi à long terme des fructifications des génets locaux de *L. amethystina* ont été mises en place dans le cadre de ma thèse. Les premiers résultats obtenus sur ce site permettent déjà de prolonger les études précédemment réalisées. Ils encouragent à poursuivre la cartographie et l'identification des génets pendant plusieurs années, afin d'obtenir davantage de données sur leur dynamique spatio-temporelle, leur apparentement, leur démographie, *etc.* L'objectif est de mieux comprendre la stratégie écologique

(recolonisation répétée ou persistance végétative) des populations de *L. amethystina* en forêt tempérée mature. La mise en place d'autres suivis permanents dans d'autres sites forestiers, analysés avec des méthodes semblables, permettrait d'estimer la part de variabilité environnementale dans la structure génétique des populations, et sa potentielle influence sur les stratégies locales (Richard *et al.* 2004).

Ces suivis pluriannuels de populations locales pourraient également être utilisés pour explorer leur variabilité fonctionnelle, en relation avec les variables environnementales. À l'aide de marqueurs de polymorphisme fonctionnel, tels que des variations d'expression géniques ou des SNP situés dans des séquences géniques, développés sur la base du génome de *L. bicolor* (Chapitre IV.1), il serait possible de caractériser la variabilité spatiale des populations de *L. amethystina* et de la relier aux conditions du milieu (conditions édaphiques, microtopographie, hôtes). Cette approche pourrait révéler des indices d'adaptation locale à l'environnement, pour le moment infirmée par les marqueurs génétiques neutres.

Enfin, à long terme, le suivi des génets locaux de *L. amethystina* pourrait être conclu par l'étude du sol : il serait possible, après la dernière année de suivi des fructifications, de cartographier et identifier génétiquement les mycéliums souterrains, pour une ultime comparaison avec l'image des génets obtenue par les carpophores. En supposant qu'il sera effectivement possible d'observer le mycélium et de le cartographier (il est difficile de savoir quelle quantité de matériel biologique sera nécessaire à l'amplification de l'ADN mycélien de *L. amethystina*), cette étape finale demandera des marqueurs génétiques très spécifiques, insensibles aux contaminations par d'autres espèces fongiques dans le sol. Grâce au développement de techniques de séquençage à haut débit, cette exploration des génets souterrains à l'aide de marqueurs puissants (par exemple des SNP développés spécifiquement sur la séquence génomique de *L. amethystina*) semble possible, et permettrait de préciser la concordance entre images épigée et souterraine des populations ectomycorhiziennes.

IV.4.3. Préciser la biogéographie de *L. amethystina* sur le continent eurasiatique

Notre étude de la biogéographie de *L. amethystina* en Europe et au Japon, couplant les approches de génétique des populations et de phylogénie, a révélé des flux géniques

importants, au sein d'une population panmictique européenne, et montré l'existence d'un isolement reproducteur entre les populations de part et d'autre de l'aire de répartition, soulevant l'hypothèse d'une spéciation cryptique à l'échelle eurasiatique. Afin de préciser la taille de voisinage des populations de *L. amethystina*, et de préciser la position des barrières aux flux de gènes, un échantillonnage plus complet géographiquement, couvrant l'Est de l'Europe et l'Asie, est indispensable. Un avantage de coupler les approches est de faciliter la tâche d'échantillonnage, notamment pour les sites où la fructification est peu abondante : en effet, il n'est pas absolument nécessaire d'échantillonner une population sur chaque site pour en caractériser la diversité génétique, mais quelques individus peuvent simplement être analysés par phylogénie multilocus et apporter ainsi des informations quant à la divergence génétique d'individus distants géographiquement. Enfin, l'approche phylogénétique, avec des marqueurs évoluant à des vitesses complémentaires, pourrait permettre de dater la divergence entre les populations eurasiatiques de *L. amethystina*, et de préciser leur histoire à l'échelle continentale.

IV.4.4. Élargir l'approche biogéographique au genre *Laccaria* dans l'Hémisphère Nord

Les phylogénies de *Laccaria* réalisées pour l'étude des populations de *L. amethystina* en Eurasie ont révélé des relations jusque-là non observées entre espèces du genre, et proposent diverses pistes à explorer.

La position du laccaire violet nord-américain *L. amethysteo-occidentalis* par rapport à *L. amethystina* d'Europe et *L. amethystina* du Japon reste peu claire. Les différentes phylogénies placent cette espèce tour à tour plus proche d'un *L. amethystina* que de l'autre, et les séquences de l'ITS et du gène codant la glucose-6-phosphate déshydrogénase (*G6PD*) de *L. amethysteo-occidentalis* partagent des caractères nucléotidiques propres à chacun des deux clades de *L. amethystina*. D'autre part, des séquences de « *L. amethystina* » originaires d'Amérique du Nord déposées sur Genbank sont plus proches de celle de *L. amethysteo-occidentalis* que de *L. amethystina* d'Europe. Il semble donc que des confusions d'identification existent entre les deux (trois) espèces, malgré une morphologie légèrement différente. L'étude de leurs relations phylogénétiques pourrait permettre de comprendre l'histoire des laccaires violets dans l'Hémisphère Nord à partir d'un ancêtre commun, et potentiellement de retracer

leurs migrations. Des populations de *L. amethysteo-occidentalis* devraient être échantillonnées en Amérique du Nord, pour être comparées aux populations européennes et asiatique (par phylogénie multilocus, et approche complémentaire de génétique des populations facilitée si les microsatellites sont transférables).

Les phylogénies basées sur les séquences ITS produites pour notre étude et disponibles dans les bases de données Unite et Genbank ont montré de nombreuses incongruences dans les positions de séquences de *L. laccata* et *L. proxima* : certaines forment un clade *L. laccata-L. proxima* soutenu, mais la plupart sont positionnées de façon erratique dans les phylogrammes. Cette absence d'unité phylogénétique pourrait refléter l'existence d'hybrides entre ces deux espèces, ou d'un complexe d'espèces *L. laccata-L. proxima* pour le moment irrésolu. Mais il s'agit plus probablement de nombreuses erreurs d'identification : ces deux espèces sont courantes dans différents habitats de l'Hémisphère Nord, et leur nom est probablement parfois utilisé indifféremment pour décrire divers laccaires bruns. Une reconstitution phylogénétique multilocus (à l'aide de marqueurs supplémentaires choisis dans des zones d'évolution assez rapide du génome) basée sur les séquences d'échantillons soigneusement identifiés, permettrait de préciser les relations entre *L. laccata* et *L. proxima*, et peut-être de révéler d'autres espèces de laccaires bruns non encore identifiées.

Enfin, les populations de *L. bicolor* ont été étudiées localement, mais jamais au-delà de l'échelle d'une forêt. Pourtant, cette espèce a une aire de répartition très large, de l'Amérique du Nord à l'Europe. Les résultats intéressants obtenus sur les populations de *L. amethystina* à très grande échelle encouragent à renouveler cette démarche de biogéographie par des approches moléculaires complémentaires et comparatives, sur des populations de *L. bicolor* de part et d'autre de l'Atlantique. Cette étude serait facilitée les marqueurs génétiques disponibles pour cette espèce, et permettrait de compléter l'histoire transcontinentale des espèces de *Laccaria*.

Conclusion

Malgré l'importance écologique des champignons mycorhiziens autour du monde, leur biologie reste encore largement méconnue, tant à l'échelle de l'organisme qu'à celle des populations dans leur milieu naturel. À travers mes travaux de thèse, j'ai abordé l'étude d'une espèce modèle de ces champignons, à l'aide d'approches écologiques et phylogéographiques. Ces organismes représentent des modèles biologiques intéressants, à la fois par leurs distributions géographiques souvent étendues et par leur écologie adaptée à leur mode de vie symbiotique. J'ai montré que, bien que plus rarement étudiées chez les populations de champignons ectomycorhiziens que chez celles d'organismes animaux ou végétaux, des questions biologiques similaires peuvent être formulées et traitées à l'aide des mêmes méthodes.

À une échelle locale nous avons étudié la taille et la survie des individus d'une population. Sur la base de nos premiers résultats, nous avons suggéré, que la combinaison de plusieurs stratégies écologiques (rudérale et/ou persistante végétativement) au sein des populations de *L. amethystina* en forêt mature serait possible, contrairement à la vision plus simpliste issue des travaux de recherche des années 1990, réalisés avec des marqueurs génétiques moins puissants. Cette hypothèse pourra être validée par le suivi sur plusieurs années de notre dispositif de relevé des fructifications. Concernant l'adaptation au milieu, nous avons pu montrer l'absence de spécialisation vis-à-vis de différents facteurs, liés aux hôtes, au climat ou à la géographie, à l'aide de marqueurs neutres. L'adaptation aux variables environnementales devra cependant être testée sur des loci sous sélection, notamment *via* des marqueurs liés à des gènes de fonctionnement de la mycorhize et potentiellement soumis à la sélection locale.

Enfin, notre approche biogéographique, originale par son ampleur et par l'association de différentes méthodes moléculaires (phylogénie et étude de structure génétique spatiale), a partiellement répondu à nos interrogations et les a élargies à un niveau supérieur. Nos études à des échelles imbriquées ont révélé une population panmictique adaptée à la diversité des habitats des forêts tempérées européennes, et mis en évidence des flux de gènes témoignant des capacités de dispersion de *L. amethystina* à très grande distance en Europe (2900 km). Nos travaux ont aussi révélé une spéciation cryptique chez *L. amethystina* de l'Europe à l'Asie, reposant ainsi la question des relations phylogénétiques au sein du genre *Laccaria*. Cette étude des populations de *L. amethystina* à travers le continent eurasiatique ouvre la voie à l'exploration de la biogéographie de ses différentes espèces sœurs à l'échelle de l'Hémisphère Nord.

Références bibliographiques

Aanen DK; Kuyper TW, Mes THM, Hoekstra RF (2000). The evolution of reproductive isolation in the ectomycorrhizal *Hebeloma crustuliniforme* aggregate (Basidiomycetes) in northwestern Europe: A phylogenetic approach. *Evolution*, 54 (4) : 1192-1206

Adams RI, Hallen HE, Pringle A (2006). Using the incomplete genome of the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera* to identify molecular polymorphisms in the related *Amanita phalloides*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1) : 218-220

Ahmad I, Carleton TJ, Malloch DW, Hellebust JA (1990). Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (R Mre) Orton. *New Phytologist*, 116 (3) : 431-441

Amend A, Keeley S, Garbelotto M (2009a). Forest age correlates with fine-scale spatial structure of Matstutake mycorrhizas. *Mycological Research*, 113 (5) : 541-551

Amend A, Garbelotto M, Fang Z, Keeley S (2009b). Isolation by landscape in populations of the prized edible mushroom *Tricholoma matsutake*. *Conservation Genetics*, sous presse

Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG (1998). Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. *New Phytologist*, 138 (1) : 151-162

Anderson IC, Chambers SM, Cairney JWG (2001). Distribution and persistence of Australian *Pisolithus* species genets at native sclerophyll forest field sites. *Mycological Research*, 108 (5) : 971-976

Austin DJ, Kristinsson KG, Anderson RM (1999). The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (3) : 1152-1156

Baar J, Ozinga WA, Kuyper TW (1994). Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps after removal of litter and humus layers in a *Pinus sylvestris* forest. *Mycological Research*, 98 : 726-728

Balasubramian S, Kim SJ, Podila GK (2002). Differential expression of a malate synthase gene during the preinfection stage of symbiosis in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 154 (2) : 517-527

Bedell JP, Chalot M, Brun A, Botton B (1995). Purification and properties of glutamine-synthetase from Douglas fir roots. *Physiologia Plantarum*, 94 (4) : 597-604

Bergemann SE, Miller SL (2002). Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytologist*, 156 (2) : 313-320

Bergemann SE, Douhan GW, Garbelotto M, Miller SL (2006). No evidence of population structure across three isolated subpopulations of *Russula brevipes* in an oak/pine woodland. *New Phytologist*, 170 (1) : 177-184

Bidartondo MI, Bruns TD (2002). Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology*, 11 (3) : 557-569

Bonello P, Bruns TD, Gardes M (1998). Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist*, 138 (3) : 533-542

Boni MF, Feldman MW (2005). Evolution of antibiotic resistance by human and bacterial niche construction. *Evolution*, 59 (3) : 477-491

Brasier CM (1987). The dynamics of fungal speciation. *Evolutionary Biology of the Fungi*, éd. par Rayner ADM, Brasier CM, Moore D. *Cambridge University Press*

Brown JKM, Hovmøller MS (2002). Epidemiology – Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, 297 (5581) : 537-541

Browning MHR, Whitney RD (1993). Infection of containerized jack pine and black spruce by *Laccaria* species and *Telephora terrestris* and seedling survival and growth after outplanting. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 23 (2) : 330-333

- Brulé C, Frey-Klett P, Pierrat JC, Courrier S, Gérard F, Lemoine MC, Rousselet JL, Sommer G, Garbaye J (2001). Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (12-13) : 1683-1694
- Brun A, Chalot M, Botton B, Martin F (1992). Purification and characterization of glutamine-synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Plant Physiology*, 99 (3) : 938-944
- Brun A, Chalot M, Duponnois R, Botton B, Dexhaimer J (1994). Immunogold localization of glutamine-synthetase and NBDP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. *Mycorrhiza*, 5 (2) : 139-144
- Brundrett MC, Ashwath N, Jasper DA (1996). Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Australia. 2. Propagules of mycorrhizal fungi and soil properties in disturbed habitats. *Plant and Soil*, 184 (1) : 173-184
- Brundrett MC (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154 (2) : 275-304
- Bruns TD, Szaro TM, Gardes M, Cullings KW, Pan JJ, Taylor DL, Horton TR, Kretzer A, Garbelotto M, Li Y (1998). A sequence database for the identification of ectomycorrhizal basidiomycetes by phylogenetic analysis. *Molecular Ecology*, 7 (3) : 257-272
- Bruns T, Tan J, Bidartondo M, Szaro T, Redecker D (2002). Survival of *Suillus pungens* and *Amanita francheti* ectomycorrhizal genets was rare or absent after a stand-replacing wildfire. *New Phytologist*, 155 (3) : 517-523
- Buschena CA, Doudrick RL, Anderson NA (1992). Persistence of *Laccaria* spp. as ectomycorrhizal symbionts of container-grown black spruce. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 22 (12) : 1883-1887
- Campbell Na, Reece JB (2004). *Biology*, 7^{ème} édition. Benjamin-Cummings Pub Company
- Carriconde F, Gryta H, Jargeat P, Mouhamadou B, Gardes M (2008). High sexual reproduction and limited contemporary dispersal in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma scalpturatum*: new insights from population genetics and spatial autocorrelation analysis. *Molecular Ecology*, 17 (20) : 4433-4445
- Cheviron ZA, Brumfield RT (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution*, 63 (6) : 1593-1605
- Courty PE, Pouysegur R, Buée M, Garbaye J (2006). Laccase and phosphatase activities of the dominant ectomycorrhizal types in a lowland oak forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (6) : 1219-1222
- Courty PE, Hoegger PJ, Kilaru S, Kohler A, Buée M, Garbaye J, Martin F, Kües U (2009). Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 182 (3) : 736-750
- Cracraft J (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*. Plenum Press
- Cuvelier JJ (1991). Characterization of birch ectomycorrhizae – (II) – *Laccaria amethystea* and *Russula ochroleuca*. *Belgian Journal of Botany*, 124 (2) : 195-203
- Dahlberg A, Stenlid J (1990). Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytologist*, 115 (3) : 487-493
- Dahlberg A, Stenlid J (1994). Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L, Fr) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist*, 128 (2) : 225-234
- Dahlberg A, Croneborg H (2006). The 33 threatened fungi in Europe. *Nature and Environment*, 136

- David P, Pujol B, Viard F, Castella V, Goudet J (2007). Reliable selfing rate estimates from imperfect population genetic data. *Molecular Ecology*, 16 (12) : 2474-2487
- Davis EE, Jong SC (1976). Basidiocarp formation by *Laccaria laccata* in agar culture. *Mycologia*, 68 (1) : 211-214
- de la Bastide PY, Kropp BR, Piché Y (1994). Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytologist*, 127 (3) : 547-556
- Dell B, Malajczuk N, Dunstan WA (2002). Persistence of some Australian *Pisolithus* species introduced into eucalypt plantations in China. *Forest Ecology and Management*, 169 (3) : 271-281
- Dettmann JR, Jacobson DJ, Taylor JW (2003). A multilocus genealogical approach to phylogenetic species recognition in the model eukaryote *Neurospora*. *Evolution*, 57 (12) : 2703-2720
- Deveau A, Kohler A, Frey-Klett P, Martin F (2008). The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist*, 180 (2) : 379-390
- Di Battista C, Bouchard D, Martin F, Généré B, Amirault JM, Le Tacon F (2002). Survival after outplanting of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N inoculated on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) cuttings. *Annals of Forest Science*, 59 (1) : 81-92
- Diaz E, Roldan A (2000). Effects of reforestation techniques on the nutrient content, photosynthetic rate and stomatal conductance of *Pinus halepensis* seedlings under semiarid conditions. *Land Degradation and Development*, 11 (5) : 475-486
- Dighton J, Poskitt JM, Brown TK (1994). Phosphate influx into ectomycorrhizal and saprotrophic fungal hyphae in relation to phosphate supply – A potential method for selection of efficient mycorrhizal species. *Mycological Research*, 97 (3) : 355-358
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti MJ, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, Vincenot L, Gout L, Rouxel T (2009). The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02149.x
- Dobzhansky T (1947). Adaptive changes induced by natural selection in wild populations of *Drosophila*. *Evolution*, 1 (1) : 1-16
- Dolan JR (2005). An introduction to the biogeography of aquatic microbes. *Aquatic Microbial Ecology*, 41 (1) : 39-48
- Donges K, Schlobinski D, Crèmer E, Rexer KH, Kost G (2008). Six newly developed microsatellite markers of *Laccaria amethystina*, using an improved CSSR approach. *Mycological Progress*, 7 (4) : 285-290
- Doudrick RL, Anderson NA (1989). Incompatibility factors and mating competence of 2 *Laccaria* spp. (Agaricales) associated with black spruce in northern Minnesota. *Phytopathology*, 79 (6) : 694-700
- Douhan GW, Vincenot L, Rizzo DM, Selosse MA. New directions in population genetics of ectomycorrhizal fungi. *En préparation*
- Dunham SM, Kretzer A, Pfender ME (2003). Characterization of Pacific golden chanterelle (*Cantharellus formosus*) genet size using co-dominant microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 12 (6) : 1607-1618
- Dunham SM, O'Dell TE, Molina R (2006). Forest stand age and the occurrence of chanterelle (*Cantharellus*) species in Oregon's central Cascade Mountains. *Mycological Research*, 110 (12) : 1433-1440
- Duponnois R, Garbaye J (1991). Effect of dual inoculation of Douglas fir with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* and mycorrhization helper bacteria (MHB) in 2 bare-root forest nurseries. *Plant and Soil*, 138 (2) : 169-176

Duponnois R, Garbaye J (1991). Techniques for controlled synthesis of the Douglas fir – *Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annales des Sciences Forestières*, 48 (6) : 641-650

Duponnois R, Garbaye J, Bouchard D, Churin JL (1994). The fungus specificity of mycorrhization helper bacteria (MHBs) used as an alternative to soil fumigation for ectomycorrhizal inoculation of bare-root Douglas fir planting stocks with *Laccaria laccata*. *Plant and Soil*, 157 (2) : 257-262

Durall DM, Jones MD, Wright EF, Kroeger P, Coates KD (1999). Species richness of ectomycorrhizal fungi in cutblocks of different sizes in the Interior Cedar-Hemlock forests of northwestern British Columbia: sporocarps and ectomycorrhizae. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 29 (9) : 1322-1332

Dutech C, Enjalbert J, Fournier E, Delmotte F, Barrès B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44 (10) : 933-949

Egli S, Ayer F (1997). Est-il possible d'améliorer la production de champignons comestibles en forêt ? *Revue Forestière Française*, 49 : 235-243

Egli S, Peter M, Buser C, Stahel W, Ayer F (2006). Mushroom picking does not impair future harvests – results of a long-term study in Switzerland. *Biological Conservation*, 129 (2) : 271-276

Excoffier L, Laval G, Schneider (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1 : 47-50

Fiore-Donno AM, Martin F (2001). Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist*, 152 (3) : 533-542

Fitter AH, Garbaye J (1994). Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and Soil*, 159 : 123-132

Ford EB (1940). Polymorphism and taxonomy. *The new systematics*, éd. par Huxley J

Founoune H, Duponnois R, Ba AM, Sall S, Branget I, Lorquin J, Neyra M, Chotte JL (2002). Mycorrhiza Helper Bacteria stimulated ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytologist*, 153 (1) : 81-89

Frank AB (1885). Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 3 : 128-145

Frey-Klett P, Pierrat JC, Garbaye J (1997). Location and survival of mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* during establishment of ectomycorrhizal symbiosis between *Laccaria bicolor* and Douglas fir. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1) : 139-144

Frey P, Frey-Klett P, Garbaye J, Berge O, Heulin T (1997). Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir *Laccaria bicolor* mycorrhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (5) : 1852-1860

Frey-Klett P, Churin JL, Pierrat JC, Garbaye J (1999). Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. *Soil Biology and Biochemistry*, 31 (11) : 1555-1562

Fries N (1977). Germination of *Laccaria laccata* spores *in vitro*. *Mycologia*, 69 (4) : 848-850

Fries N (1983). Spore germination, homing reaction and intersterility groups in *Laccaria laccata* (Agaricales). *Mycologia*, 75 (2) : 221-227

Fries N, Mueller GM (1984). Incompatibility systems, cultural features and species circumscriptions in the ectomycorrhizal genus *Laccaria* (Agaricales). *Mycologia*, 76 (4) : 633-642

Futuyma DJ, Mayer GC (1980). Non-allopatric speciation in animals. *Systematic Zoology*, 29 (3) : 254-271

- Gagnon J, Langlois CG, Garbaye J (1991). Growth and ectomycorrhiza formation of container-grown red oak seedlings as a function of nitrogen-fertilization and inoculum type of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 21 (7) : 966-973
- Gagnon J, Langlois CG, Bouchard D, Le Tacon F (1995). Growth and ectomycorrhizal formation of container-grown Douglas fir seedlings inoculated with *Laccaria bicolor* under four levels of nitrogen fertilization. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 25 (12) : 1953-1961
- Garbaye J, Delwaulle JC, Diangana D (1988). Growth response of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management*, 24 (2) : 151-157
- Garbaye J, Duponnois R, Wahl JL (1990). The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps – Effect on symbiosis establishment on Douglas fir. *Symbiosis*, 9 (1-3) : 267-273
- Garbaye J (1994). Helper bacteria – A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 128 (2) : 197-210
- Gardes M, Mueller GM, Fortin JA, Kropp BR (1991). Mitochondrial DNA polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. *Mycological Research*, 95 (2) : 206-216
- Gardes M, Bruns TD (1996). Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 74 (10) : 1572-1583
- Geml J, Tulloss RE, Laursen GA, Sazanava NA, Taylor DL (2008). Evidence for strong inter- and intracontinental phylogeographic structure in *Amanita muscaria*, a wind-dispersed ectomycorrhizal basidiomycete. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48 (2) : 694-701
- Génére B, Amirault JM, Ginisty C (2004). Douglas mycorrhizé par *Laccaria bicolor* S238N : Bilan des plantations du Cemagref. *Revue Forestière Française*, 56 (4) : 297-306
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse MA, Martin F (1999). High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology*, 8 (12) : 2003-2013
- Gillespie JH (2000). Genetic drift in an infinite population: the pseudo hitchhiking model. *Genetics*, 155 (2) : 909-919
- Giraud T, Refrégier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME (2008). Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 45 (6) : 791-802
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent MH, Rouxel T (2007). Genome structure impacts molecular evolution of the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*, 9 (12) : 2978-2992
- Griffiths AJF, Wessler SR, Lewontin RC (2008). Introduction to genetic analysis, 9^{ème} édition. *W. Freeman & Company*
- Grime JP (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist*, 111 : 1169-1194
- Grime JP (2002). Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties, 2^{nde} édition. *Wiley*
- Grove TS, Le Tacon F (1993). Mycorrhiza in plantation forestry. *Advances in Plant Pathology*, 23 : 191-227
- Gryta H, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R (1997). Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology*, 6 (4) : 353-364

- Gryta H, Debaud JC, Marmeisse R (2000). Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity*, 84 (3) : 294-302
- Gryta H, Carriconde F, Charcosset JY, Jargeat P, Gardes M (2006). Population dynamics of the ectomycorrhizal fungal species *Tricholoma populinum* and *Tricholoma scalpturatum* associated with black poplar under differing environmental conditions. *Environmental Microbiology*, 8 (5) : 773-786
- Guerin-Laguette A, Plassard C, Mousain D (2000). Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 46 (9) : 790-799
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R (2001). Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology*, 10 (5) : 1121-1131
- Guidot A, Debaud JC, Marmeisse R (2002). Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiology Ecology*, 42 (3) : 477-486
- Guidot A, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R (2003). Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 161 : 539-547
- Halling RE, Osmundson TW, Neves MA (2008). Pacific boletes: Implications for biogeographic relationships. *Mycological Research*, 112 : 437-447
- Hardy OJ, Vekemans X (2002). SPAGeDi: a versatile computer program to analyze spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2 : 618-620
- Harris H (1966). Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society Series B – Biological Sciences*, 164 (995) : 298-310
- Hedh J, Samson P, Erland S, Tunlid A (2008). Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycological Research*, 112 (8) : 965-975
- Hedrick PW (2001). Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (11) : 629-636
- Hedrick PW (2005). Genetics of populations, 3^{ème} édition. *Jones & Bartlett*
- 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 (2) : 289-298
- Henrion B, Di Battista C, Bouchard D, Vairelles D, Thompson BD, Le Tacon F, Martin F (1994). Monitoring the persistence of *Laccaria bicolor* as an ectomycorrhizal symbiont of nursery-grown Douglas fir by PCR of the rDNA intergenic spacer. *Molecular Ecology*, 3 (6) : 571-580
- Hitchcock CJ, Chambers SM, Cairney JWG (2006). Development of polymorphic simple sequence repeat markers for *Pisolithus macrocarpus*. *Molecular Ecology Notes*, 6 : 443-445
- Hoeksema JD, Thompson JN (2007). Geographic structure in a widespread plant-mycorrhizal interaction: pines and false truffles. *Journal of Evolutionary Biology*, 20 (3) : 1148-1163
- Hortal S, Pera J, Parladé J (2009). Field persistence of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus*: effects of inoculation strain, initial colonization level, and site characteristics. *Mycorrhiza*, 19 (3) : 167-177
- Hughes KW, Petersen RH, Mata JL, Psurtseva NV, Kovalenko AE, Morozova OV, Lickey EB, Cifuentes Blanco J, Lewis DP, Nagasawa E, Halling RE, Takehashi S, Aime MC, Bau T, Henkel T (2007). *Megacollybia* (Agaricales). *Report of the Totori Mycological Institute*, 45 : 1-57

Hung LLL, Molina R (1986). Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III: Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 16 (4) : 802-806

Irwin DE (2009). Incipient ring speciation revealed by a migratory divide. *Molecular Ecology*, 18 (14) : 2923-2925

Ishida TA, Nara K, Tanaka K, Kinoshita A, Hogetsu T (2008). Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist*, 180 (2) : 491-500

Jacobson KM, Miller OK, Turner BJ (1993). Randomly Amplified Polymorphic DNA markers are superior to somatic incompatibility tests for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (19) : 9159-9163

James TY, Vilgalys R (2001). Abundance and diversity of *Schizophyllum commune* spore clouds in the Caribbean detected by selective sampling. *Molecular Ecology*, 10 (2) : 471-479

James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, 443 (7113) : 818-822

Jany JL, Garbaye J, Martin F (2002). *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist*, 154 (3) : 651-659

Jany JL, Bousquet J, Gagné A, Khasa DP (2006). Simple sequence repeat (SSR) markers in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for environmental monitoring of introduced strains and molecular ecology applications. *Mycological Research*, 110 (1) : 51-59

Jones MD, Durall DM, Cairney JW (2003). Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist*, 157 (3) : 399-422

Jumpponen A, Trappe JM, Cazares E (2002). Occurrence of ectomycorrhizal fungi on the forefront of retreating Lyman Glacier (Washington, USA) in relation to time since deglaciation. *Mycorrhiza*, 12 (1) : 43-49

Karabaghli-Degron C, Sotta B, Bonnet M, Gay G, Le Tacon F (1998). The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 140 (4) : 723-733

Kay E, Vilgalys R (1992). Spatial distribution and genetic relationships among individuals in a natural population of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*, 84 (2) : 173-182

Kim SJ, Hiremath ST, Podila GK (1999). Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from the ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*, 103 (2) : 168-172

Kimura M (1987). Molecular evolutionary clock and the neutral theory. *Journal of Molecular Evolution*, 26 : 24-33

Kreitman M, Akashi H (1995) Molecular evidence for natural selection. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26 : 403-422

Kretzer AM, Luoma DL, Molina R, Spatafora JW (2003). Taxonomy of the *Rhizopogon vinicolor* species complex based on analysis of ITS sequences and microsatellite loci. *Mycologia*, 95 (3) : 480-487

Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2004). Microsatellite markers reveal the below ground distribution of genets in two species of *Rhizopogon* forming tuberculate ectomycorrhizas on Douglas fir. *New Phytologist*, 161 (1) : 313-320

- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2005). Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology*, 14 (8) : 2259-2268
- Kropp BR, Fortin JA (1986). Formation and regeneration of protoplasts from the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 64 (6) : 1224-1226
- Kropp BR, Fortin JA (1988). The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 66 (2) : 289-294
- Kropp BR (1990). Variable interactions between non mycorrhizal and ectomycorrhizal strains of the basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*, 94 (3) : 412-415
- Kropp BR, Langlois CG (1990). Ectomycorrhizae in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 20 (4) : 438-451
- Kropp BR, Mueller GM (1999) *Laccaria. Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile*, éd. par Cairney JWG, Chambers SM. *Springer-Verlag*
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW (2005). Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology*, 14 (8) : 2259-2268
- Kreuzwieser J, Stulen I, Wiersema P, Vaalburg W, Rennenberg H (2000). Nitrate transport processes in *Fagus-Laccaria*-mycorrhizae. *Plant and Soil*, 220 (1-2) : 107-117
- Kunin CM (1993). Resistance to antimicrobial drugs – A worldwide calamity. *Annals of Internal Medicine*, 118 (7) : 557-561
- Kuo CH, Janzen FJ (2004). Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5 (4) : 425-437
- L'Héritier P, Teissier G (1934). Étude d'une population de Drosophiles en équilibre. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences*, 197 : 1765-1767
- Landsteiner K, Wiener AS (1940). An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 43 : 223-224
- Laurila A, Karttunen S, Merilä J (2002). Adaptive phenotypic plasticity and genetics of larval life histories in two *Rana temporaria* populations. 56 (3) : 617-627
- Le Tacon F, Garbaye J, Bouchard D, Chevalier G, Olivier JM, Guimberteau J, Poitou N, Frochot H (1988). Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. *Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry*, éd. par Lalonde M, Piché Y.
- Leake JR, Johnson D, Donnelly DP, Muckle GE, Boddy L, Read DJ (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 82 (8) : 1016-1045
- Lee SL, Ng KKS, Saw LG, Lee CT, Muhammad N, Tani N, Tsumura Y, Koskela J (2006). Linking the gaps between conservation research and conservation management of rare dipterocarps: a case study of *Shorea lumutensis*. *Biological Conservation*, 131 (1) : 72-92
- Lenormand T (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 17 (4) : 183-189
- Lewontin RC, Hubby JL (1966). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. 11. Amount in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54 : 595-609

- Lian CL, Narimatsu M, Nara K, Hogetsu T (2006). *Tricholoma matsutaka* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of ectomycorrhizal communities. *New Phytologist*, 171 (4) : 825-836
- Liang Y, Guo LD, Ma KP (2004). Spatial pattern of the most common late-stage ectomycorrhizal fungi in a subtropical forest in Dujiangyan, Southwest of China. *Acta Botanica Sinica*, 46 (1) : 29-34
- Liang Y, Guo LD, Ma KP (2005). Population genetic structure of an ectomycorrhizal fungus *Amanita manginiana* in a subtropical forest over two years. *Mycorrhiza*, 15 (2) : 137-142
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C (1995). Spatial genetic structure of a tropical understorey shrub *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*, 82 : 1420-1425
- Lorillou S, Botton B, Martin F (1996). Nitrogen source regulates the biosynthesis of NADP-glutamate dehydrogenase in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 132 (2) : 289-296
- Lucic E, Fourrey C, Kohler A, Martin F, Chalot M, Brun-Jacob A (2008). A gene repertoire for nitrogen transporters in *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*, 180 (2) : 343-364
- Lumley TC, Farquhar ML, Peterson RL (1995). Ectomycorrhiza formation between *Pseudotsuga menziesii* seedling roots and monokaryotic and dikaryotic isolates of *Laccaria bicolor*. *Mycorrhiza*, 5 (4) : 237-244
- Lynch M, Koskella B, Schaack S (2006). Mutation pressure and the evolution of organelle genomic architecture. *Science*, 311 : 1727-1730
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18 (4) : 189-197
- Martin F, Rubini P, Cote, Kotke I (1994). Aluminum polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* – A ²⁷Al nuclear-magnetic resonance study. *Planta*, 194 (2) : 241-246
- Martin F, Diez J, Dell B, Delaruelle C (2002). Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist*, 153 (2) : 345-357
- Martin F, Aerts A, Ahrén D, Brun A, Danchin EGJ, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buée M, Brotkstein P, Canbäck B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbé J, Lin YC, Legué V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet Mehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kuës U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardon PM, Rouzé P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV (2008). The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 452 : 88-93
- Martin F, Selosse MA (2008). The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist*, 180 (2) : 296-310
- Martin F, Nehls U (2009). Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insight. *Current Opinion in Plant Biology*, 12 (4) : 508-515
- Marx DH, Bryan WC (1969). Studies on ectomycorrhizae of pine in an electronically air-filtered, air-conditioned, plant-growth room. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 47:1903–1909
- Marx DH, Ruehle JL, Kenney DS, Cordell CE, Riffle JW, Molina RJ, Pawuk WH, Navratil S, Tinus RW, Goodwin OC (1982). Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedling. *Forest Science*, 28 (2) : 373-400
- Massicotte HB, Peterson RL, Melville LH (1989). Hartig net structure of ectomycorrhizae synthesized between *Laccaria bicolor* (Tricholomataceae) and 2 hosts – *Betula alleghaniensis* (Betulaceae) and *Pinus resinosa* (Pinaceae). *American Journal of Botany*, 76 (11) : 1654-1667

Mayr E (1940). Speciation phenomena in birds. *American Naturalist*, 74 : 249-278

Mazars E, Lesjean S, Banuls AL, Gilbert M, Vincent V, Gicquel B, Tibayrenc M, Locht C, Supply P (2001). High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (4) : 1901-1906

McLain RJ, Christensen HH, Shannon MA (1998). When amateurs are the experts: Amateur mycologists and wild mushroom politics in the Pacific Northwest, USA. *Society and Natural Resources*, 11 (6) : 615-626

McNabb RFR (1972). The Tricholomataceae of New Zealand. I. *Laccaria* Berk. & Br. *New Zealand Journal of Botany*, 10 : 461-484

Millington WM, Corden JM (2005). Long term trends in outdoor *Aspergillus* / *Penicillium* spore concentrations in Derby, UK from 1970 to 2003 and a comparative study in 1994 and 1996 with the indoor air of two local houses. *Aerobiologia*, 21 (2) : 105-113

Mohan V, Natarajan K, Ingleby K (1993). Anatomical studies on ectomycorrhizas. 2. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza*, 3 (1) : 43-49

Molina R (1979). Ectomycorrhizal inoculation of containerized Douglas fir and logdpole pine seedlings with 6 isolates of *Pisolithus tinctorius*. *Forest Science*, 25 (4) : 585-590

Molina R, Chamard J (1983). Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. 2. Effects of fertilizer forms and levels on ectomycorrhizal development and growth of container-grown Douglas fir and ponderosa pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 13 (1) : 89-95

Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In Allen M F, *Mycorrhizal functioning: an interactive plant-fungal process*

Moncalvo JM, Buchanan PK (2008). Molecular evidence for long distance dispersal across the Southern Hemisphere in the *Ganoderma applanatum-australe* species complex (Basidiomycota). *Mycological Research*, 112 : 425-436.

Mraz P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet P, IntraBioDiv Consortium (2007). Genetic structure of *Hypochaeris uniflora* (Asteraceae) suggests vicariance in the Carpathians and rapid post-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refuge. *Journal of Biogeography*, 34 (12) : 2100-2114

Mueller GM (1992). Systematic of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana: Botany*, 30 : 1-158

Mueller GJ, Mueller GM, Shih LH, Ammirati JF (1993). Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales). 1. Meiosis and postmeiotic mitosis. *American Journal of Botany*, 80 (3) : 316-321

Mueller GM, Ammirati JF (1993). Cytological studies in *Laccaria* (Agaricales). II. Assessing phylogenetic relationships among *Laccaria*, *Hydnangium*, and other. *American Journal of Botany*, 80 (3) : 322-329

Muller LAH, Lambaerts M, Vangronsveld J, Colpaert JV (2004). AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of pioneer populations of *Suillus luteus*. *New Phytologist*, 164 (2) : 297-303

Muller LAH, Vangronsveld J, Colpaert JV (2007). Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats. *Molecular Ecology*, 16 (22) : 4728-4737

Munyanziza E, Ngaga YM (2006). Survey of edible mushrooms of the miombo woodlands through economic incentives in two villages of Tanzania. *Discovery and Innovation*, 18 (4) : 304-310

- Munzenberger B, Kottke I, Oberwinkler F (1992). Ultrastructural investigations of *Arbutus unedo* – *Laccaria amethystea* mycorrhiza synthesized *in vitro*. *Trees – Structure and Function*, 7 (1) : 40-47
- Nara K, Nakaya H, Hogetsu T (2003). Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytologist*, 158 (1) : 193-206
- Nara K, Hogetsu T (2004). Ectomycorrhizal fungi on established shrubs facilitate subsequent seedling establishment of successional plant species. *Ecology*, 85 (6) : 1700-1707
- Nei M (1977). *F*-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 41 (2) : 225-233
- Nguyen C, Yan W, Le Tacon F, Lapeyrie F (1992). Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. *Plant and Soil*, 143 (2) : 193-199
- Niculita-Hirzel H, Labbé J, Kohler A, Le Tacon F, Martin F, Sanders IR, Kües U (2008). Gene organization of the mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci. *New Phytologist*, 180 (2) : 329-342
- O'Brien (1994). A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (13) : 5748-5755
- O'Malley Ma (2007). The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology*, 5 (8) : 647-651
- Orr HA, Coyne Ja (1989). The genetics of postzygotic isolation in the *Drosophila virilis* group. *Genetics*, 121 (3) : 527-537
- Ortega-Martinez P, Martinez-Pena F (2008). A sampling method for estimating sporocarps production of wild edible mushrooms of social and economic interest. *Investigacion Agraria – Sistemas y Recursos Forestales*, 17 (3) : 228-237
- Parker GA, Partridge L (1998). Sexual conflict and speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences*. 353 (1366) : 261-274
- Parker IM, Rodriguez J, Loik ME (2003). An evolutionary approach to understanding the biology of invasions: Local adaptation and general-purpose genotypes in the weed *Verbascum thapsus*. *Conservation Biology*, 17 (1) : 59-72
- Parladé J, Pera J, Luque J (2004). Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza*, 14 (3) : 171-176
- Peakall R, Ruibal M, Lindenmayer DB (2003). Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution*, 57 (5) : 1182-1195
- Petit RJ, Hampe A (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37 : 187 -214
- Phipps CJ, Taylor TN (1996). Mixed arbuscular mycorrhizae from the Triassic of Antarctica. *Mycologia*, 88 (5) : 707-714
- Pietravalle S, Lemarie S, van den Bosch F (2006). Durability of resistance and cost of virulence. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (1) : 107-116
- Pringle A, Vellinga EC (2006). Last chance to know? Using literature to explore the biogeography and invasion biology of the death cap mushroom *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr. :Fr.). *Biological Invasions*, 8 : 1131-1144

- Pringle A, Adams RI, Cross HB, Bruns TD (2009). The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America. *Molecular Ecology*, 18 : 817-833
- Pritchard JK (2001). Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *American Journal of Human Genetics*, 69 (1) : 124-137
- Prospero JM, Blades E, Mathison G, Naidu R (2005). Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*, 21 (1) : 1-19
- Raidl S, Agerer R (1992). Studies on ectomycorrhiza. 42. The ontogeny of the rhizomorphs of *Laccaria amethystina*, *Hydnum rufescens* and *Sarcodon imbricatus*. *Nova Hedwigia*, 55 (3-4) : 279-307
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 289 (5486) : 1920-1921
- Redecker D, Szaro TM, Bowman RJ, Bruns TD (2001). Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage successions. *Molecular Ecology*, 10 (4) : 1025-1034
- Richard F, Moreau PA, Selosse MA, Gardes M (2004). Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 82 (12) : 1711-1729
- Richard F, Selosse MA, Gardes M (2009). Facilitated establishment of *Quercus ilex* in shrub-dominated communities within a Mediterranean ecosystem : do mycorrhizal partners matter ? *FEMS Microbiology Ecology*, 68 (1) : 14-24
- Rincon A, Ruiz-Diez B, Garcia-Fraile S, Garcia JAL, Fernandez-Pascual M, Pueayo JJ, de Felipe MR (2005). Colonization of *Pinus halepensis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 51 (3) : 303-311
- Rousset F (1997). Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145 : 1219-1228
- Rousset F (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8 (1) : 103-106
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent MH (2003). A 10 -year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (8) : 871-881
- Roy M, Dubois MP, Proffit M, Vincenot L, Desmarais E, Selosse MA (2008). Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multi-host symbiont. *Molecular Ecology* 17 (12) : 2825-2838
- Rypien KL (2008). African dust is an unlikely source of *Aspergillus sydowii*, the causative agent of sea fan disease. *Marine Ecology Progress Series*, 367 : 125-131
- Salusso MM, Morana LB (1995). Ectomycorrhizal community structure in pinaceous forest from Altos La Sierra, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, 68 (4) : 509-513
- Sanon KB, Ba AM, Delaruelle C, Duponnois R, Martin F (2009). Morphological and molecular analyses in *Scleroderma* species associated with some Caesalpinoid legumes, Dipterocarpaceae and Phyllanthaceae trees in southern Burkina Faso. *Mycorrhiza*, 19 (8) : 571-584
- Sato H, Yumoto T, Murakami N (2007). Cryptic species and host specificity in the ectomycorrhizal genus *Strobilomyces* (Strobilomycetaceae). *American Journal of Botany*, 94 (10) : 1630-1641
- Sawyer SA, Hartl DL (1992). Populations genetics of polymorphism and divergence. *Genetics*, 132 (4) : 1161-1176

- Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JWG (1999). Molecular investigation of genet distribution and genetic variation of *Cortinarius rotundisporus* in eastern Australian sclerophyll forests. *New Phytologist*, 142 (3) : 561-568
- Sbrana C, Agnolucci M, Bedini S, Bedini S, Lepera A, Toffanin A, Giovannetti M, Nuti MP (2002). Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiology Letters*, 211 (2) : 195-201
- Schwartz B, Dell DM, Hughes JM (1997). Preventing the emergence of antimicrobial resistance – A call for action by clinicians, public health officials, and patients. *Journal of the American Medical Association*, 278 (11) : 944-945
- Selosse MA (1998). Étude de populations de champignons ectomycorhiziens du genre *Laccaria*, introduits ou spontanés, sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse, Université Paris-Sud – Orsay
- Selosse MA, Le Tacon F (1998). The land flora : a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution*, 13 (1) : 15-20
- Selosse MA, Martin F, Bouchard D, Le Tacon F (1999). Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a Douglas fir plantation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (5) : 2006-2014
- Selosse MA, Weiss JM, Jany JL, Tillier A (2002). Communities and populations of sebacinoïd basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology*, 11 (9) : 1831-1844
- Selosse MA (2003). Founder effect in a young *Leccinum duriusculum* (Schultze) Singer population. *Mycorrhiza*, 13 (3) : 143-149
- Selosse MA, Richard F, He XH, Simard SW (2006). Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology and Evolution*, 21 (11) : 621-628
- Selosse MA, Roy M (2009). Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science*, 14 (2) : 64-70
- Simard SW, Durall DM (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 82 (8) : 1140-1165
- Singer R (1986). The Agaricales in Modern Taxonomy. 4^{ème} édition. *Koeltz Scientific Books*
- Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139 : 457-462
- Slatkin M, Veuille M (2002). Modern developments in theoretical population genetics – The legacy of Gustave Malécot. *Oxford University Press*
- Smith ME, Douhan GW, Fremier AK, Rizzo DM (2009). Are true multihost fungi the exception or the rule? Dominant ectomycorrhizal fungi on *Pinus sabiniana* differ from those on co-occurring *Quercus* species. *New Phytologist*, 182 (2) : 295-299
- Smith SE, Read DJ (2009). Mycorrhizal symbiosis, 9^{ème} édition. *Academic Press, New York*
- Smouse PE, Peakall R (1999). Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82 : 561-573
- Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent MH, Happstad I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N (2006). Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (1) : 67-75
- Stack RW, Sinclair WA, Larsen AO (1975). Preservation of basidiospores of *Laccaria laccata* for use as mycorrhizal inoculum. *Mycologia*, 67 (1) : 167-170

- Stebbins GL Jr (1940). The significance of polyploidy in plant evolution. *The American Naturalist*, 750 (74) : 54-66
- Stiller JW, Denton AL (1995). One hundred years of *Spartina alterniflora* (Poaceae) in Willapa Bay, Washington: random amplified polymorphic DNA analysis of an invasive population. *Molecular Ecology*, 4 (3) : 455-464
- Storz JH, Kelly JK (2008). Effects of spatially varying selection on nucleotide diversity and linkage disequilibrium: Insights from deer mouse globin genes. *Genetics*, 180 (1) : 367-379
- Sundaram S, Kim SJ, Suzuki H, McQuattie CJ, Hiremath ST, Podila GK (2001). Isolation and characterization of a symbiosis-regulated ras from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 14 (5) : 618-628
- Taylor JW, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D (2006). Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom Fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B – Biological Sciences*, 361 (1475) : 1947-1963
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse MA (2007). Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia*, 151 (2) : 206-217
- Teste FP, Schmidt MG, Berch SM, Bulmer C, Egger KN (2004). Effects of ectomycorrhizal inoculants on survival and growth of interior Douglas fir seedlings on reforestation sites and partially rehabilitated landings. *Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne de Recherche Forestière*, 34 (10) : 2074-2088
- Thomson BD, Grove TS, Malajczuk N, Hargy GESJ (1994). The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* labill in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist*, 126 (3) : 517-524
- Tommerup IC, Barton JE, O'Brien PA (1995). Reliability of RAPD fingerprinting of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* and *Rhizoctonia*. *Mycological Research*, 99 (2) : 179-186
- Trappe JM (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annual Review of Phytopathology*, 15 : 203-222
- Tsutsui ND, Suarez AV, Holway DA, Case TJ (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (11) : 5948-5983
- van der Linde S, Alexander IJ, Anderson IC (2009). Spatial distribution of sporocarps of stipitate hydroid fungi and their belowground mycelium. *FEMS Microbiology Ecology*, 69 (3) : 344-352
- Vincenot L, Sthultz C, Labbé J, Dubois MP, Nara K, Martin F, Selosse MA. Wide-scale population genetics of the ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina* reveal extensive gene flow over Europe and putative speciation over Eurasia. *En préparation*
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Hogetsu T (2006a). Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystina*, by a dual-suppression-PCR technique. *Molecular Ecology Notes*, 6 (1) : 130-132
- Wadud MA, Lian CL, Nara K, Hogetsu T (2006b). Isolation and characterization of five microsatellite loci in an ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (3) : 700-702
- Wadud MA (2007). Reproduction ecology of pioneer ectomycorrhizal fungi, *Laccaria amethystina* and *L. laccata*, in the volcanic desert on Mount Fuji. Thèse, *Université de Tokyo, Japon*
- Wallace AR (1853). On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, S8

Wallace AR (1869). The Malay Archipelago. *Harper*

Wallander H, Nylund JE (1991). Effects of excess nitrogen on carbohydrate concentration and mycorrhizal development of *Pinus sylvestris* L. seedlings. *New Phytologist*, 119 (3) : 405-411

Wallander H, Nylund JE (1992). Effects of excess nitrogen and phosphorus starvation on the extramatrical mycelium of ectomycorrhizas of *Pinus sylvestris* L. *New Phytologist*, 120 (4) : 495-503

Weber J, Diez J, Selosse MA, Tagu D, Le Tacon F (2002). SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas fir plantations. *Mycorrhiza*, 12 (1) : 19-27

Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38 (6) : 1358-1370

West JS, Biddulph JE, Fitt BDL, Gladders P (1999). Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK. *Annals of Applied Biology*, 135 (2) : 535-546

Winder RS, Keefer ME (2008). Ecology of the 2004 morel harvest in the Rocky Mountain Forest District of British Columbia. *Botany – Botanique*, 86 (10) : 1152-1167

Wright S (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28 : 114-138

Wright S (1969). Evolution and the genetics of populations. Volume 2, The theory of gene frequencies. *University of Chicago Press*

Wright S (1978). Evolution and the genetics of populations. Volume 4, Variability within and among natural populations. *University of Chicago Press*

Wu BY, Nara K, Hogetsu T (2005). Genetic structure of *Cenococcum geophilum* populations in primary successional volcanic deserts on Mount Fuji as revealed by microsatellite markers. *New Phytologist*, 165 (1) : 285-293

Xu JP, Sha T, Li YC, Zhao ZW, Yang ZL (2008). Recombination and genetic differentiation among natural populations of the ectomycorrhizal mushroom *Tricholoma matsutake* from southwestern China. *Molecular Ecology*, 17 (5) : 1238-1247

Yamanaka T (1999). Utilization of inorganic and organic nitrogen in pure cultures by saprotrophic and ectomycorrhizal fungi producing sporophores on urea-treated forest floor. *Mycological Research*, 103 (7) : 811-816

Yoshimura J, Clark CW (1991). Individuals adaptations in stochastic environments. *Evolutionary Ecology*, 5 (2) : 173-192

Yun W, Hall IR (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany – Revue Canadienne de Botanique*, 82 (8) : 1063-1073

Zhou ZH, Miwa M, Hogetsu T (2000). Genet distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus grevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. *Journal of Plant Research*, 113 (1112) : 365-374

Annexe

Communications scientifiques

Au cours de ma thèse, d'octobre 2006 à décembre 2009, j'ai eu l'occasion de présenter mes projets et résultats scientifiques à des congrès nationaux et internationaux :

- **Vincenot L**, Labbé J, Hortal-Botifol S, Selosse MA. Contrasted multi-scale genetic patterns in populations of the model ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina*. **Poster** au 12^{ème} Congrès de l'ESEB (European Society for Evolutionary Biology), Turin, août 2009
- **Sthultz C**, **Vincenot L**, Dubois MP, Selosse MA. Contrasted multi-scale genetic patterns in populations of the model ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina*. **Poster** au Colloque Botany & Mycology 2009, Snowbird, Utah, juillet 2009
- **Vincenot L**, Labbé J, Dubois MP, Selosse MA. Structuration génétique des populations du basidiomycète ectomycorhizien modèle *Laccaria amethystina* à l'échelle continentale. **Exposé** au 7^{ème} Colloque National de la Société Française de Phytopathologie, Lyon, juin 2009
- **Vincenot L**, Labbé J, Dubois MP, Selosse MA. Multi-scale structure of populations of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in Europe.

ET **Labbé J**, **Vincenot L**, Le Tacon F, Selosse MA, Martin F. The development of simple sequence repeat markers in the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *L. amethystina* for molecular ecology applications.

Posters au 21^{ème} Symposium New Phytologist, Montpellier, décembre 2008

- **Vincenot L**, Dubois MP, Roy M, Martin F, Selosse MA. Structurations spatiale et fonctionnelle de populations du champignon ectomycorhizien *Laccaria amethystina* à l'échelle européenne. **Poster** aux 7^{èmes} Rencontres de Phytopathologie/Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, janvier 2008.

Pendant cette même période, une partie des résultats obtenus au cours de mon Master 2 (encadré par Lilian Gout et Thierry Rouxel, Équipe Bioger, INRA Versailles-Grignon) et de ma thèse ont été valorisés par leur publication dans des revues scientifiques à comité de relecture :

- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C, Davey J, Barbetti M, Li H, Moreno-Rico O, Phillips D, Despeghel JP, **Vincenot L**, Gout L, Rouxel T (2009). The *Leptosphaeria maculans* – *Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathology*, sous presse
- Cardin L, **Vincenot L**, Balesdent MH (2009). First report of *Pilidium concavum* on *Bergenia crassifolia*. *Plant Disease*, 93 (5) : 48
- **Vincenot L**, Tedersoo L, Richard F, Horcine H, Kõljalg U, Selosse MA (2008). Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, from two Estonian boreal forests. *Mycorrhiza*, 19 (1) : 15-25
- Roy M, Dubois MP, Proffit M, **Vincenot L**, Desmarais E, Selosse MA (2008). Evidence from population genetics that the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* is an actual multihost symbiont. *Molecular Ecology*, 17 (12) : 2825-2838
- **Vincenot L**, Balesdent MH, Li H, Barbetti MJ, Sivasithamparam K, Gout L, Rouxel T (2008). Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathology*, 98 : 321-329
- Gout L, Kuhn ML, **Vincenot L**, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent MH, Rouxel T (2007). Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology*, 9 (12): 2978-2992.

Fungal associates of *Pyrola rotundifolia*, a mixotrophic Ericaceae, from two Estonian boreal forests

Lucie Vincenot · Leho Tedersoo · Franck Richard ·
Houria Horcine · Urmas Kõljalg · Marc-André Selosse

Received: 28 April 2008 / Accepted: 25 August 2008 / Published online: 16 September 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract *Pyrola rotundifolia* (Ericaceae, Pyroleae tribe) is an understorey subshrub that was recently demonstrated to receive considerable amount of carbon from its fungal mycorrhizal associates. So far, little is known of the identity of these fungi and the mycorrhizal anatomy in the Pyroleae. Using 140 mycorrhizal root fragments collected from two Estonian boreal forests already studied in the context of mixotrophic Ericaceae in sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region, we recovered 71 sequences that corresponded to 45 putative species in 19 fungal genera. The identified fungi were mainly ectomycorrhizal basidiomycetes, including *Tomentella*, *Cortinarius*, *Russula*, *Hebeloma*, as well as some ectomycorrhizal and/or endophytic ascomycetes. The *P. rotundifolia* fungal communities of the two forests did not differ significantly in terms of species richness, diversity and nutritional mode. The relatively high diversity retrieved suggests that *P. rotundifolia* does not have a strict preference for any fungal taxa. Anatomical analyses showed typical arbutoid mycor-

rhizae, with variable mantle structures, uniseriate Hartig nets and intracellular hyphal coils in the large epidermal cells. Whenever compared, fungal ultrastructure was congruent with the molecular identification. Similarly to other mixotrophic and autotrophic pyroloids in the same forests, *P. rotundifolia* shares its mycorrhizal fungal associates with surrounding trees that are likely a carbon source for pyroloids.

Keywords Arbutoid mycorrhizae · Ericaceae · Ectomycorrhizal communities · Endophytic fungi · Mixotrophy · Mycorrhizal anatomy

Introduction

A major recent breakthrough in plant nutrition was the discovery that some green forest plants, although able to perform photosynthesis, recovered significant amount of carbon (C) from their mycorrhizal fungi. This strategy, called mixotrophy (MX), was documented in green orchids (Gebauer and Meyer 2003; Bidartondo et al. 2004; Julou et al. 2005; Abadie et al. 2006) and, more recently, in a group of forest perennial subshrubs from the Ericaceae (Tedersoo et al. 2007; Zimmer et al. 2007), namely the sub-tribe Pyroleae, here referred to as pyroloids. These two plant families also harbour fully achlorophyllous, heterotrophic species that obtain all their C from their mycorrhizal fungi, the so-called mycoheterotrophic (MH) plants (Leake 2004). Indeed, the occurrence of MX species was proposed as an evolutionary predisposition to the rise of MH taxa (Tedersoo et al. 2007). Namely, *Pyrola aphylla* is fully non-chlorophyllous and thus MH (Zimmer et al. 2007).

Two major tools contributed to advances in the study of MX (and MH) species, namely stable isotopes and

L. Vincenot (✉) · F. Richard · H. Horcine · M.-A. Selosse
Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive
(CNRS, UMR 5175), Equipe Interactions Biotiques,
1919 Route de Mende,
34293 Montpellier Cedex 5, France
e-mail: lucie.vincenot@cefe.cnrs.fr

L. Tedersoo · U. Kõljalg
Institute of Ecology and Earth Sciences,
University of Tartu, 40 Lai Str.,
51005 Tartu, Estonia

L. Tedersoo
Natural History Museum of Tartu University,
46 Vanemuise Str.,
51005 Tartu, Estonia

molecular methods, to identify fungal symbionts. Organisms usually have similar abundance in ^{13}C to their food source, such as MH plants and their associated fungi (Trudell et al. 2003; Tedersoo et al. 2007). As an exception, however, fungi obtaining C from living or dead plants are richer in ^{13}C than autotrophic plants (Hobbie et al. 2003; Zeller et al. 2007). A contribution of fungal C to MX biomass can thus be detected in the ^{13}C content as a deviation from that of surrounding autotrophic plants. The comparison of the ^{13}C content of MX and fully heterotrophic MH plants and fungi allows quantification of fungal C used in MX biomass (Gebauer and Meyer 2003). With such assumptions, Tedersoo et al. (2007) found a variable level of C heterotrophy in four green pyroloid species from two Estonian sites, ranging from 0% to 67.5%. Zimmer et al. (2007) found MX in pyroloids in only one out of six and none out of three sites in Germany and California, respectively.

Fungi associated with pyroloids form arbutoid mycorrhizae, sometimes referred to as 'ectendomycorrhizae', i.e. mycorrhizae with a hyphal sheath, an intercellular Hartig net and coils in root cells (Robertson and Robertson 1985; Smith and Read 1997; Massicotte et al. 2008). Molecular methods demonstrated that most fungal associates of European green pyroloids were biotrophic, falling into two ecological categories (Tedersoo et al. 2007; Zimmer et al. 2007). Some species belonged to taxa often reported as plant roots endophytes (e.g. Helotiales) whose physiological roles, if any, remain unknown (Schulz and Boyle 2005). Most species belonged to taxa forming ectomycorrhizal (ECM) associations with forest trees, belonging to Asco- and mainly Basidiomycetes. This suggests that overstorey trees are the ultimate C source for MX pyroloids, via the fungi, exactly as described for MX orchids (Bidartondo et al. 2004; Julou et al. 2005; Abadie et al. 2006; Selosse et al. 2006) and MH plants from temperate forests (Leake 2004). Accordingly, Hashimoto et al. (2005) provided ex situ evidence that labelled C can move from Japanese larch (*Larix kaempferi*) to co-cultivated *Pyrola incarnata*, suggesting that fungal links to the tree are crucial for MX pyroloids.

Despite this, mycorrhizal associates of pyroloids are hitherto known from a limited number of species and sites only. Especially, the fungal associates of *P. rotundifolia*, the most heterotrophic green pyroloid reported so far (with the exception of the MH *P. aphylla*), are still unknown. Despite careful ultrastructural studies of arbutoid mycorrhizae in six North-American pyroloid species (Robertson and Robertson 1985; Massicotte et al. 2008), no morphological nor ultrastructural data are available for *P. rotundifolia* mycorrhizae. In this study, we further document fungal associates of pyroloids by investigating mycorrhizal associates of *P. rotundifolia* in two boreal forests in Estonia where other

pyroloid mycorrhizal fungi were already identified (Tedersoo et al. 2007). In addition, we included molecular data from the site where a high heterotrophy level (67.5% of fungal C in the biomass) was previously detected for *P. rotundifolia* (Tedersoo et al. 2007). A combination of molecular and transmission electron microscopy (TEM) methods was used to identify the mycorrhizal fungi and to describe their interaction with host roots.

Materials and methods

Study site and sampling

Mycorrhizal sampling was performed on August 14th, 2005 at Kärä (Saaremaa Island, NW Estonia; geocode: 58°20'N, 22°18'E) and on September 10th, 2005 at Värä (SE Estonia: 57°57'N, 27°40'E). These sites, distant from approximately 350 km, were sampled and described more profoundly in Tedersoo et al. (2007). Briefly, they were selected because of their dense population of at least three pyroloid species and a canopy covering <70% of the area. The tree host community in Kärä was mainly composed of 100- to 120-year-old Scots pine (*Pinus sylvestris*) with sparse Norway spruce (*Picea abies*) undergrowth. The site of Värä comprised a 60- to 80-year-old mixed forest of Scots pine and silver birch (*Betula pendula*). Haplic podzol on limnoglacial sand dunes is the dominant soil type at both sites.

At each site, root systems of the *P. rotundifolia* were manually separated from ten 20×40 cm (depth=20 cm) soil cores, taken at least 10 m apart from each other. Plant roots were identified by tracing root systems to rhizomes and leaves. Roots covered by more or less dense wefts of hyphae were considered potentially mycorrhizal. Seven 2- to 3-mm root fragments colonised by fungi were selected from different parts of each root system. Healthier and cleaner roots were selected, as they were more likely to contain a higher proportion of living tissue of true mycorrhizal fungi rather than of saprotrophs or endophytes. These 140 root fragments (seven fragments from ten root systems in two sites) were photographed using a Carl Zeiss Stemi 2000-CS stereo microscope and Axioskop2 light microscope (Fig. 1), transferred to 100 ml of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) lysis buffer [100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB] and kept at -20°C before molecular investigations. Moreover, whenever mycorrhizae were long enough (more than 3 mm), a subsample of the remaining mycorrhizal length was preserved for TEM investigations by quick fixation using 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 ml 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) and stored at 4°C during 3 months.

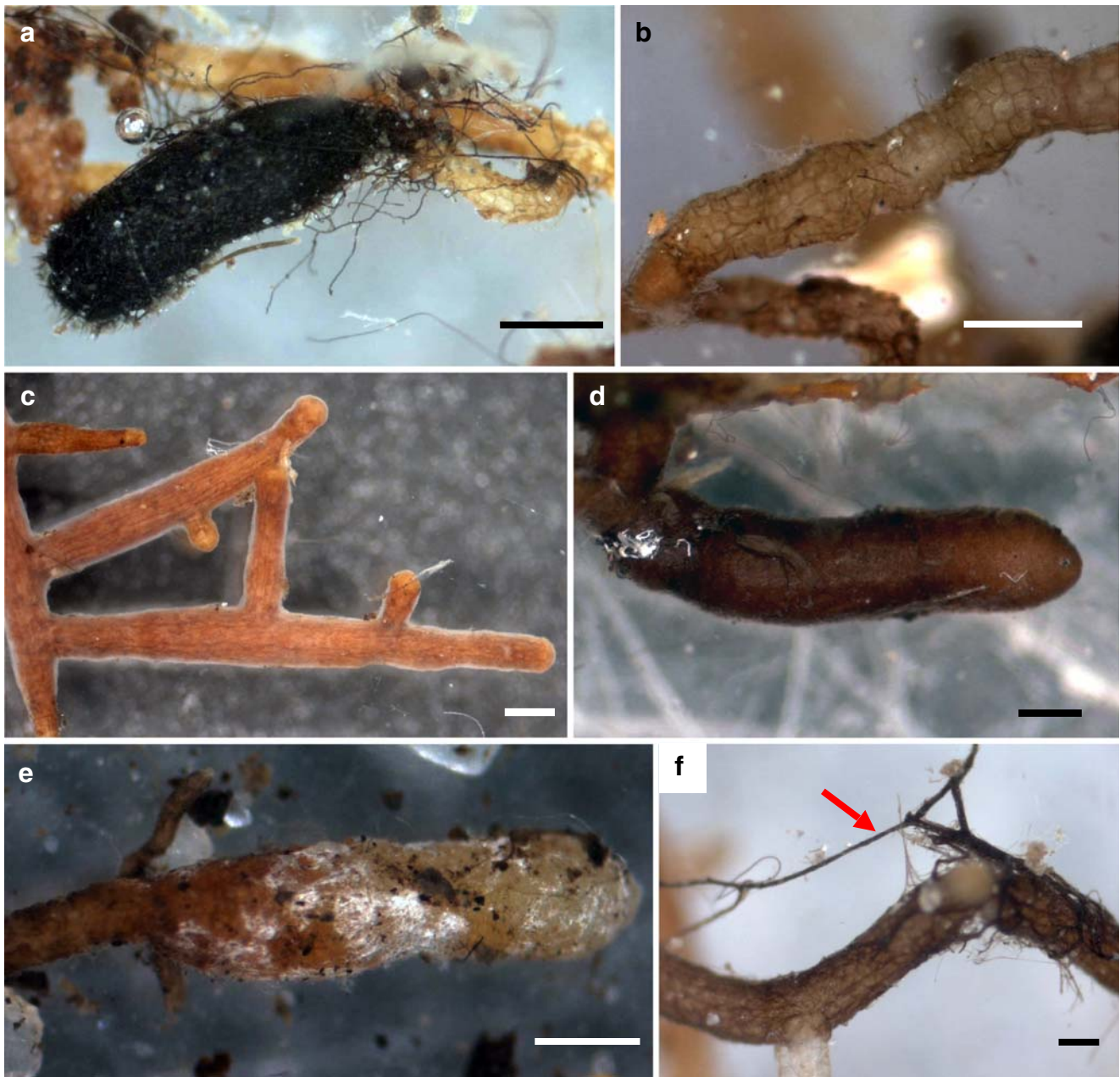


Fig. 1 External morphology of selected *P. rotundifolia* mycorrhizae identified by ITS sequencing. **a** *Tomentella* sp.1; **b** *Amphinema-Tylospora* sp.1; **c** *Inocybe* sp.1; **d** *Tomentella* sp.5; **e** *Hebeloma* sp.2; **f** *Tomentella* sp.6 with a rhizomorph (arrowed). Bars are 0.4 mm

Molecular identification of fungal partners

DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) amplification of fungal intergenic ribosomal DNA spacer (ITS) were performed as in Selosse et al. (2002) using the two primers sets ITS1F + ITS4 and ITS1F + ITS4B. Whenever a single fragment was amplified, it was tentatively sequenced from both strands using the two amplification primers, as in Tedersoo et al. (2007). Whenever more than one fragment was amplified, as revealed on gel after PCR or by sequence data, the PCR

product was discarded from further analysis. This is because (1) we aim at documenting qualitatively the link to ECM fungi, but not the whole fungal diversity on *P. rotundifolia*, and (2) our previous analyses suggested that samples with multiple PCR products were mostly colonised by endophytic fungi in addition to an ECM fungus (Tedersoo et al. 2007). Sequences from both strands were edited using Sequencher™ 4.6 for MacOS X (Genes Codes, Ann Arbor, USA), and all sequence stretches that were ambiguous, due to the presence of additional fungal endophytes, were pruned from the edited sequence. To

identify the fungi, the sequences were queried against GenBank, European Molecular Biology Laboratory (EMBL) and the ECM fungal sequence database UNITE (Kõljalg et al. 2005) using blastN or fasta3 algorithms (all reported sequence identities are based on full-length pairwise alignments). To infer species, sequences were grouped based on >97.0% sequence identity over the whole ITS region (Tedersoo et al. 2003). Although there is no universally applicable threshold (Nilsson et al. 2008), we found 97.0% the most suitable molecular species criterion due to the low quality of some sequences. For each species, the best corrected sequence was deposited in EMBL sequence database. Putative trophic status of the detected species is that of the reported lifestyle of the closest matching taxa.

TEM investigations

Among mycorrhizae successfully typed by molecular analysis (see above), ten subsamples showing divergent morphotypes were available for TEM analysis. They were rinsed three times with the fixing buffer and then dehydrated in an ascending series of ethanol solution to 100%. They were then incubated in two changes of absolute acetone and infiltrated in Epon–Araldite resin that was polymerised for 24 h at 60°C. Embedded samples were processed for ultramicrotomy: semi-thin sections of 0.5 µm were stained with 1% toluidine blue and used to check for the pattern of fungal colonisation. Ultra-thin (70 nm) sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate and used for TEM analyses under a JEM-1200 EX II electron microscope (Jeol, Tokyo, Japan) to score mycorrhizal colonisation and features corroborating molecular identification (e.g. intercellular communications, dolipores or Woronin bodies; Selosse et al. 2004; Abadie et al. 2006).

Statistics

Differences in PCR amplification and sequencing success between study sites were tested using chi-square tests. When the sample size in a distribution was too low ($n < 5$), as for the comparisons of the main genus abundances, the fungal ecologies and the ratio of Ascomycota to Basidiomycota, a chi-square tests with Yates' correction were applied. As the number of successfully typed mycorrhizae differed between Kärle and Värka (respectively 50 and 20), data were rarefied as in Richard et al. (2005) to the size of the smaller sample to compare the fungal richness between sites. To compare the fungal diversity, Shannon diversity index was calculated. Because this index is sensitive to rare species, we also calculated the Fisher's alpha value for each pyroloid species using data from this and previous (Tedersoo et al. 2007) study.

Results

Identification of mycorrhizal fungi

Using the primer set ITS1F + ITS4, PCR amplifications were successful for 123 out of the 140 samples (Table 1), with a similar success rate at both sites ($\chi^2=0.603$, $df=1$, $p=0.438$). Direct sequencing of PCR products was successful for 71 root fragments (Table 1), with a higher success at Kärle: 85.0% of the PCR products were successfully sequenced at Kärle compared to only 31.7% at Värka ($\chi^2=27.463$, $df=1$, $p<0.001$). Because samples showing evidence of dual colonisation (more than one PCR fragments or mixed sequences) were not further considered, we obtained 51 sequences at Kärle and 20 sequences at Värka. Out of the seven root fragments sampled per plant, one to four produced a readable sequence at Värka compared to one to six at Kärle. All PCR amplifications that amplified with the basidiomycete-specific primer set ITS1F + ITS4B were also successful with the more general, fungal-specific ITS1F + ITS4 set. Whenever both primer pairs produced sequences ($n=31$), these were 100% identical.

In all, the sequence analysis resulted in 65 sequences (Tables 1 and 2) that were attributed to 45 species including 40 Basidiomycota. *Amphinema-Tylospora* sp.1 and *Hebeloma* sp.2 were found in four and three root samples, respectively. Eight fungal species were found in two different root samples. Several fungal genera were identified at both two sites (Table 1), including most of the dominant ones. The relative frequency of *Cortinarius* and *Tomentella* were similar at both sites ($\chi^2=5.256$, $df=2$, $p=0.072$). *Tomentella*, *Russula*, *Hebeloma*, *Cortinarius* and *Sebacina* spp. that were relatively frequent at Kärle were rare or absent from Värka (Table 1), but with no significant difference ($p>0.05$). Only two species, *Amphinema-Tylospora* sp.1 and *Tomentella* cf. *subclavigera* 1, were shared between the two sites (Table 2). The relative proportion of Asco- and Basidiomycota was similar at the two sites ($\chi^2=0.386$, $df=1$, $p=0.534$). All recovered taxa were ECM (Table 2) besides four putative endophytes and a single uncertain species (*Tulasnella* sp.1). The ecology of the associated fungi ('ECM' vs. 'endophytes and unknowns') did not significantly differ between the two sites ($\chi^2=0.279$, $df=1$, $p=0.597$).

The fungal richness for each site, as estimated by rarefaction of the data to a sample size of 11, was slightly higher at Värka than at Kärle (respectively, 7.25 and 6.9; Table 1). The Shannon diversity index were similar at both sites (2.37 at Kärle, 2.14 at Värka), whilst Fisher's alpha values, less influenced by rare species, were 10.61 and 15.65 for Kärle and Värka, respectively (Table 1), indicating that the relatively higher diversity at Värka was masked by the low typing success.

Table 1 Summary of the fungal taxa found on *P. rotundifolia* at Kärle and Värka

	Kärle	Värka	Both sites
Number of samples	70	70	140
Successful PCR ^a	60 (85.7%)	63 (90.0%)	123 (87.8%)
Successful typing ^b	51 (72.9%)	20 (28.6%)	71 (48.6%)
Number of diverging sequences	47	18	65
Number of species ^c	33	14	45
Richness after rarefaction ^d	6.93	7.25	–
Shannon diversity index	2.37	2.14	–
Fisher's alpha value	10.61	15.65	–
Genera			
Ascomycetes			
<i>Helotiales</i>	0	1	1
<i>Humaria</i>	1	0	1
<i>Otidea</i>	1	0	1
<i>Phialocephala</i>	1	1	2
<i>Wilcoxina</i>	1	0	1
Basidiomycetes			
<i>Amphinema/Tylospora</i>	2	1	2
<i>Ceratobasidium</i>	0	1	1
<i>Cortinarius</i>	3	4	7
<i>Hebeloma</i>	3	0	3
<i>Inocybe</i>	2	0	2
<i>Piloderma</i>	0	1	1
<i>Russula</i>	4	1	5
<i>Sebacina</i>	3	0	3
<i>Sistotrema</i>	0	1	1
<i>Suillus</i>	1	0	1
<i>Tomentellopsis</i>	1	0	1
<i>Tomentella</i>	10	2	11
<i>Tricholoma</i>	1	1	2
<i>Tulasnella</i>	1	0	1

^a All primer sets included^b After successful amplification and discard of the samples showing evidence of dual colonisation^c All sequences showing more than 97% similarity are supposed to be from the same species—see “Materials and methods”^d Rarefied to a sample number of ten

Mycorrhizal morphology

Extraradical and mantle hyphal colonisation of the sampled mycorrhizae varied strongly among arbutoid mycorrhizal roots (Fig. 1). The mantle ranged from dense (Fig. 1a, d) to none (Fig. 1b), with sometimes emanating rhizomorphs (Fig. 1f), depending on fungal species. Variation in mantle thickness and anatomy was confirmed in transverse sections. In particular, plectenchymatous mantles of one to four hyphal layers occurred in *Hebeloma*, *Cortinarius* and *Tricholoma* mycorrhizae (Figs. 2a–c), whereas dense pseudoparenchymatous mantles comprising four to six hyphal layers occurred on mycorrhizae of *Russula* and *Tomentella* spp. (Figs. 2d–f and 3a, c). No organised mantle was seen in *Wilcoxina*, *Tulasnella* (Fig. 3e) and *Amphinema-Tylospora* mycorrhizae. All mycorrhizae investigated by TEM ($n=10$; Table 2) showed a uniseriate Hartig net between the outermost cortical cells (Fig. 3d), but in some cases, the wall between some epidermal cells remained uncolonised. Fungi never invaded more deeply the root tissues. As a result of colonisation, cortical cells appeared compressed and deformed radially (Fig. 3a). Several hyphal layers were sometimes present at

the junction between three or more cortical cells, as well as around the innermost part of the Hartig net, at the basis of epidermal cells (not shown). The cortical cells were large compared to the central cylinder and were filled with hyphal pelotons (Fig. 3a, c). Hyphae penetrated from the Hartig net without producing any visible plant wall reaction at the penetration site (Fig. 3d). Intracellular hyphae had similar size and cell wall thickness in Hartig net and epidermal cells (Fig. 3a, d). The colonisation often occurred on lateral roots (Fig. 1a–e), but did not always reach the root apex. Uncolonised apex showed that the large cortical cells were of epidermal origin (Fig. 3b) and were often collapsed when uncolonised. Their nucleus was laterally positioned before colonisation (Fig. 3b), but central upon fungal colonisation.

TEM analyses revealed dolipores in all ten investigated samples, further supporting their identification as members of Basidiomycota. No Woronin bodies were observed in these root fragments, indicating the paucity of ascomycetous hyphae. Unfortunately, no sample was available to investigate the possible ascomycete mycorrhizae detected by molecular tools. In mycorrhizae of *Tulasnella* sp.1 and *Sebacina* (clade A) sp.1, imperforate parenthesomes featur-

Table 2 Mycorrhizal fungi species associated with *P. rotundifolia* at Kärle and Värksa

GB accession numbers	Putative species	Occurrences on sites ^a		Putative ecology ^b	Best blastN match ^c	% similarity
		Kärle	Värksa			
EU668904, EU668905, EU668906	<i>Amphinema-Tylospora</i> sp. 1 ^d	2 (2)	2 (3)	ECM	1— <i>Amphinema byssoides</i> AY838271 2—Atheliaceae AM181408	85.5 93.0
EU668907	<i>Amphinema-Tylospora</i> sp.2 ^d	1 (1)		ECM	<i>Amphinema byssoides</i> AY219838 Atheliaceae AM181414	83.4 93.0
EU668908	<i>Ceratobasidium</i> sp.1		1 (1)	ECM	<i>Ceratobasidium</i> sp. AY805606 <i>Rhizoctonia</i> sp. AJ419929	98.9 99.0
EU668909	<i>Cortinarius</i> cf. <i>anisatus</i> 1		1 (1)	ECM	<i>Cortinarius anisatus</i> UDB001318 <i>Cortinarius anisatus</i> DQ117929	98.3 99.0
EU668910	<i>Cortinarius</i> cf. <i>saniosus</i> 1		1 (1)	ECM	<i>Cortinarius saniosus</i> DQ102669 <i>Cortinarius saniosus</i> DQ102681	99.5 99.0
EU668911	<i>Cortinarius</i> sp.1	1 (1)		ECM	<i>Cortinarius hinnuleoarmillatus</i> UDB001460 <i>Cortinarius umbrinolens</i> AY669658	96.5 96.0
EU668912	<i>Cortinarius</i> sp.2	1 (1)		ECM	<i>Cortinarius atrocoeruleus</i> UDB001011 <i>Cortinarius</i> cf. <i>flexipes</i> DQ974714	98.6 98.0
EU668913	<i>Cortinarius</i> sp.3	1 (1)		ECM	<i>Cortinarius sertipes</i> UDB000068 <i>Cortinarius</i> sp. EF218749	95.8 99.0
EU668914	<i>Cortinarius</i> sp.4		1 (1)	ECM	<i>Cortinarius sertipes</i> UDB000068 <i>Cortinarius</i> sp. EF411087	96.1 98.0
EU668915	<i>Cortinarius</i> sp.5		1 (1)	ECM	<i>Cortinarius belleri</i> AY669685 <i>Cortinarius traganus</i> DQ367900	95.8 95.0
EU668916	<i>Hebeloma</i> cf. <i>sinapizans</i> 1	1 (1)		ECM	<i>Hebeloma sinapizans</i> AY320380 <i>Hebeloma sinapizans</i> AF096977	99.7 99.0
EU668917	<i>Hebeloma</i> sp.1	1 (1)		ECM	<i>Hebeloma leucosarx</i> AB211268 <i>Hebeloma velutipes</i> AF430254	97.4 94.0
EU668918, EU668919	<i>Hebeloma</i> sp.2	3 (5)		ECM	<i>Hebeloma velutipes</i> UDB002445 <i>Hebeloma</i> sp. EF093151	99.8 99.0
EU668920	Helotiales sp.1		1 (1)	End.	Uncultured Helotiales EF026053 <i>Epacris microphylla</i> root associated fungus AY268217	98.9 99.0
EU668921, EU668922	<i>Humaria hemisphaerica</i> 1	2 (2)		ECM	<i>Humaria hemisphaerica</i> UDB000988 <i>Humaria hemisphaerica</i> DQ200832	100.0 99.0
EU668923	<i>Inocybe</i> sp.1 ^d	1 (1)		ECM	<i>Inocybe leiocephala</i> UDB000635 Cortinariaceae AM181384	94.6 99.0
EU668924	<i>Inocybe</i> cf. <i>geophylla</i> 1	1 (1)		ECM	<i>Inocybe geophylla</i> UDB000632 <i>Inocybe geophylla</i> var. <i>lilacina</i> AM882869	99.3 98.0
EU668925	<i>Otidea</i> cf. <i>tuomikoskii</i> 1	1 (1)		ECM	<i>Otidea tuomikoskii</i> AF072086 <i>Otidea tuomikoskii</i> AF072085	92.1 99.0
EU668926	<i>Phialocephala</i> sp.1	1 (1)		End.	<i>Phialocephala fortinii</i> EU103612 <i>Phialocephala</i> sp. EF101770	92.0 92.0
EU668927	<i>Phialocephala</i> sp.2		2 (2)	End.	<i>Phialocephala fortinii</i> AY394921 <i>Phialocephala fortinii</i> AY394915	99.7 99.0
EU668928	<i>Piloderma</i> sp.1		1 (1)	ECM	<i>Piloderma sphaerosporum</i> UDB001750 <i>Piloderma</i> sp. AY0970053	99.8 99.0
EU668929	<i>Russula</i> sp.1		1 (2)	ECM	<i>Russula favrei</i> EF530944 <i>Russula pascua</i> AY061705	96.7 96.0
EU668930	<i>Russula fuscorubroides</i> 1	1 (1)		ECM	<i>Russula fuscorubroides</i> AF418624 <i>Russula queletii</i> EU248592	100.0 95.0
EU668931	<i>Russula</i> sp.2	1 (1)		ECM	<i>Russula postiana</i> AF230898 <i>Russula</i> sp. EF218809	99.3 96.0
EU668932	<i>Russula</i> sp.3	1 (3)		ECM	<i>Russula acrifolia</i> UDB0002470 <i>Russula</i> sp. EF218808	94.0 98.0
EU668933	<i>Sebacina</i> (clade A) sp.1	2 (2)		ECM	<i>Sebacina</i> sp. UDB000773 Sebacinales EF030946	92.5 98.0
EU668934	<i>Sebacina</i> (clade B) sp.1	1 (1)		End.	<i>Sebacina vermifera</i> DQ520096 Sebacinaceae DQ273405	87.6 98.0

Table 2 (continued)

GB accession numbers	Putative species	Occurrences on sites ^a		Putative ecology ^b	Best blastN match ^c	% similarity
		Kärle	Värle			
EU668935	<i>Sistotrema</i> cf. <i>alboluteum</i> sp. 1	1 (1)		ECM	<i>Sistotrema alboluteum</i> AJ606043	99.8
					<i>Sistotrema alboluteum</i> AJ606042	99.0
EU668936, EU668937	<i>Suillus</i> cf. <i>variegatus</i> 1	2 (2)		ECM	<i>Suillus variegatus</i> UDB000664	98.9
					<i>Suillus luteus</i> DQ658861	98.0
EU668938	<i>Tomentella</i> sp.1	1 (1)		ECM	<i>Tomentella lateritia</i> UDB000267	94.1
					<i>Tomentella</i> sp. EF218839	93.0
EU668939	<i>Tomentella</i> sp.2	1 (1)		ECM	<i>Tomentella badia</i> UDB000961	96.2
					<i>Tomentella</i> sp. EF218830	100.0
EU668940, EU668941, EU668942	<i>Tomentella</i> sp.3	2 (3)		ECM	<i>Tomentella bryophila</i> UDB000035	95.7
					<i>Tomentella</i> sp. U83482	93.0
EU668943	<i>Tomentella</i> sp.4	2 (2)		ECM	<i>Tomentella bryophila</i> UDB000035	93.2
					<i>Tomentella</i> sp. EF411113	96.0
EU668944	<i>Tomentella</i> sp.5	1 (1)		ECM	<i>Tomentella bryophila</i> UDB000035	91.7
					<i>Tomentella</i> sp. AJ534917	99.0
EU668945	<i>Tomentella</i> sp.6	1 (3)		ECM	<i>Tomentella lilacinogrisea</i> UDB000272	94.7
					<i>Tomentella</i> sp. EF218821	98.0
EU668946	<i>Tomentella</i> sp.7	1 (1)		ECM	<i>Tomentella fuscocinerea</i> UDB000776	96.0
					<i>Tomentella</i> sp. EF218826	99.0
EU668947	<i>Tomentella</i> sp.8	1 (1)		ECM	<i>Tomentella bryophila</i> UDB000035	91.5
					<i>Tomentella</i> sp. EF218827	98.0
EU668948	<i>Tomentella</i> sp.9	1 (1)		ECM	<i>Tomentella fuscocinerea</i> UDB00240	95.0
					<i>Tomentella</i> sp. EF218835	95.0
EU668949, EU668950	<i>Tomentella</i> cf. <i>subclavigera</i> 1	1 (1)	1 (3)	ECM	<i>Tomentella subclavigera</i> UDB000259	100.0
					<i>Tomentella subclavigera</i> AF272939	99.0
EU668951	<i>Tomentella</i> cf. <i>subclavigera</i> 2	1 (2)		ECM	<i>Tomentella subclavigera</i> AY010275	100.0
					<i>Tomentella</i> sp. EF218839	98.0
EU668952	<i>Tomentellopsis</i> sp.1	2 (2)		ECM	<i>Tomentellopsis submollis</i> AY641459	96.7
					<i>Tomentellopsis</i> sp. AJ893353	98.0
EU668953	<i>Tricholoma</i> sp.1	1 (1)		ECM	<i>Tricholoma portentosum</i> UDB001429	99.8
					<i>Tricholoma</i> sp. AF349688	99.0
EU668954	<i>Tricholoma</i> sp.2	1 (1)		ECM	<i>Tricholoma triste</i> UDB001691	99.8
					<i>Tricholoma myomyces</i> AF377210s	99.0
EU668955	<i>Tulasnella</i> sp.1	1 (2)		?	Orchid mycorrhizal <i>Tulasnella</i> DQ925521	99.3
					<i>Tulasnellaceae</i> DG925521	99.0
EU668956	<i>Wilcoxina</i> sp.1	1 (1)		ECM	<i>Wilcoxina rehmi</i> AF266708	97.8
					<i>Wilcoxina</i> sp. AJ893249	99.0

Species for which one mycorrhiza was investigated by TEM are in bold.

^a Indication of the number of root tips harbouring the fungus with the number of plant individuals with such root tips (under brackets)

^b ECM ectomycorrhizal fungus, End. endophytic fungus

^c Best blast: (1) in Unite + EMBL data bases and (2) GenBank (only the best blast with informative taxonomy is given)

^d Taxa already found on other pyrolids by Tedersoo et al. (2007)

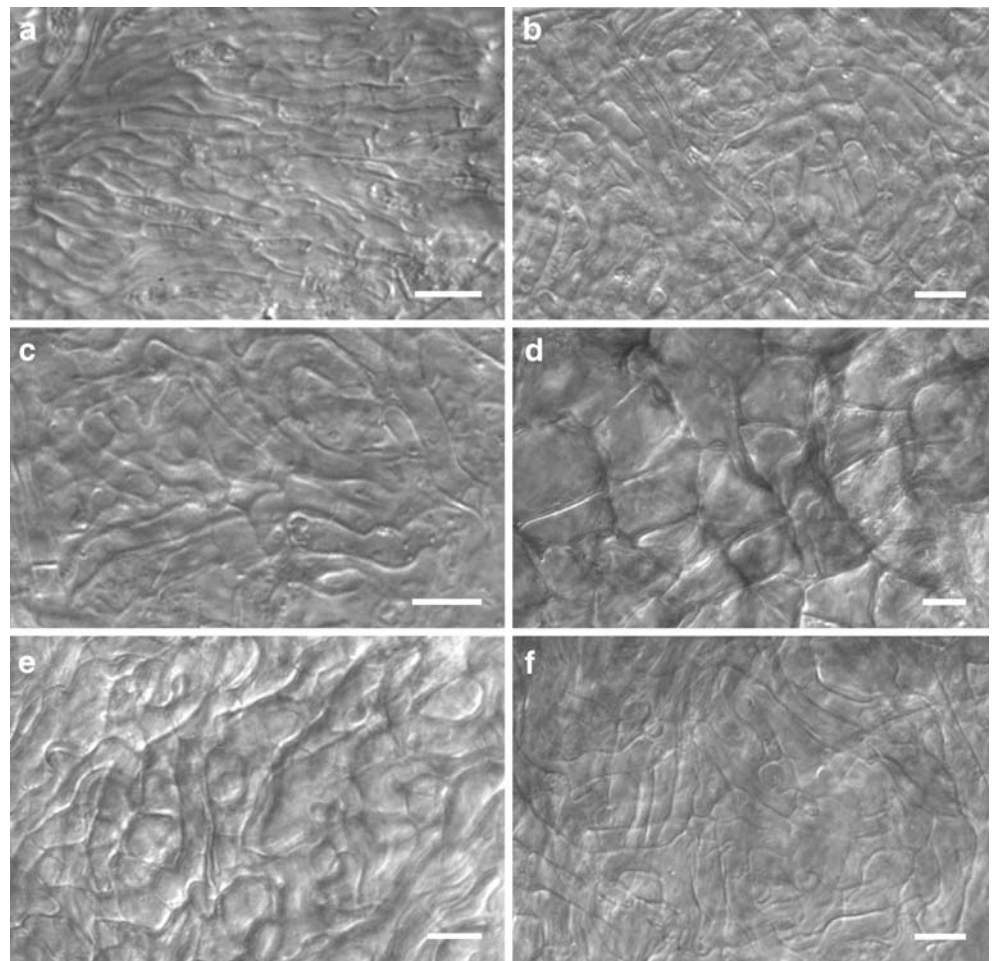
ing these two taxa and a slime typical for cell walls of tulasnelloids further supported the molecular identification (Fig. 2f). Several hyphae exhibited intra-hyphal growth (Fig. 3g). Since plant cytoplasm was poorly preserved, probably due to insufficient fixation, we obtained little evidence that the cytoplasm of the host cells was alive. However, with exception of the *Tulasnella* sp.1, mycorrhizae preservation was poor, and all cells appeared to have been fixed in a turgescence state (Fig. 3a, c): Given the thin wall, the spheroid cell shape can only be explained by turgescence, which is an indirect evidence of biotrophic

interaction. No evidence of collapsed or lysed hyphae in apparently healthy, turgescence cells was found; instead, non-collapsed hyphae were sometimes found in possibly senescent host cells (Fig. 3c) as well as joint senescence of hyphae and host cytoplasm (data not shown).

Discussion

The general shape of *P. rotundifolia* mycorrhizae (Figs. 1, 2 and 3) is congruent with previous report from other

Fig. 2 Mantle anatomy of selected mycorrhizae of *P. rotundifolia* in Kärle. **a–c** Mycorrhizae of *Hebeloma* sp.2; **d–f** mycorrhizae of *Tomentella* sp.5. **a, d** Outer mantle layers; **b, e** middle mantle layers; **c, f** inner mantle layers. Bar 5 μ m

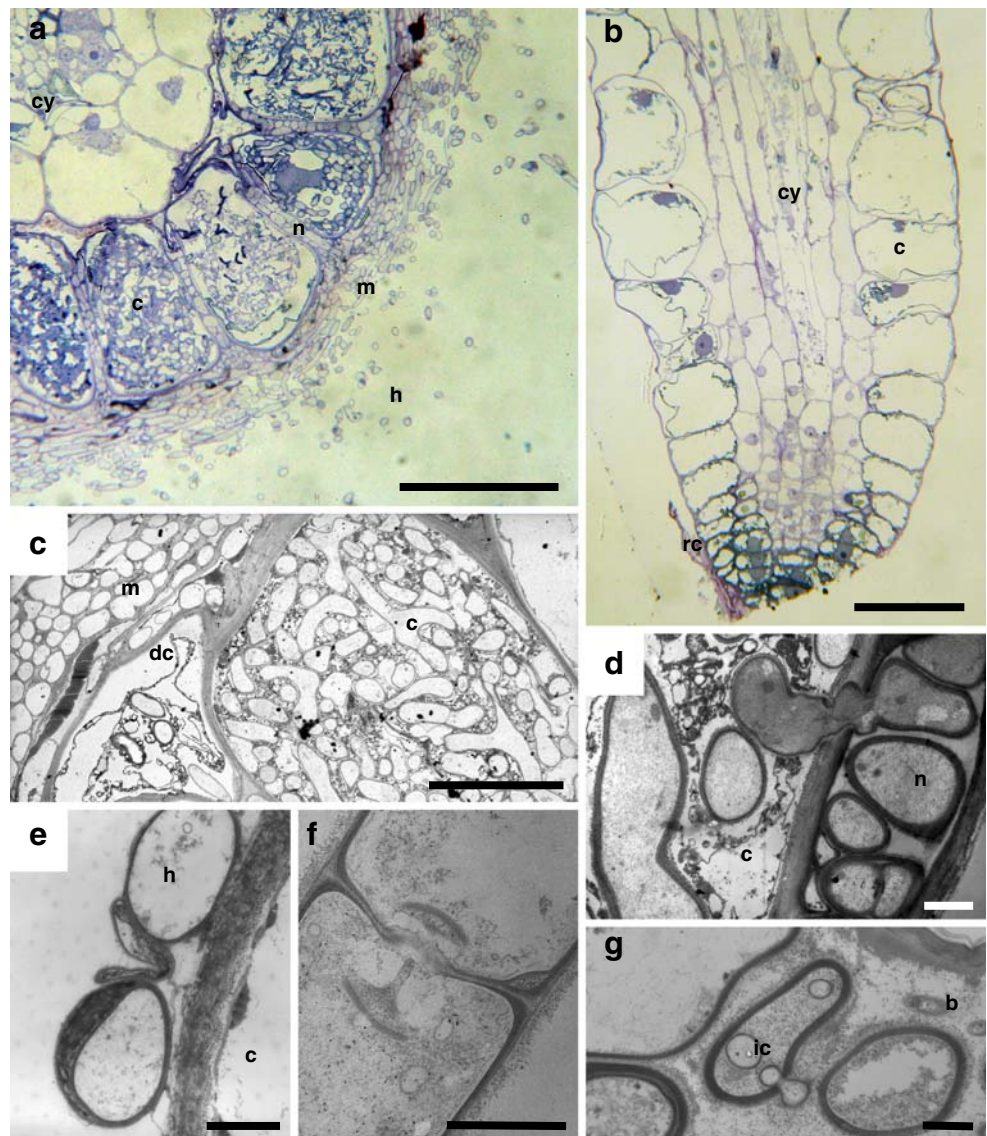


pyroloids (Robertson and Robertson, 1985; Smith and Read, 1997; Massicotte et al. 2008). They show a reduced central cylinder surrounded by a single layer of large cells colonised by fungi whose origin is epidermal (Fig. 3b) as also described for ericoid mycorrhizae (Berta and Bonfante-Fasolo 1983). The apex is often not colonized, and hyphal density in the mantle and extraradical zone is variable. Massicotte et al. (2008) also reported that the mantle can be absent (e.g. in *P. chlorantha*) or dense (e.g. in mycorrhizae formed by *Thelephoraceae*-like and *Atheliaceae*-like fungi). The pattern of intracellular colonisation and the narrow uniseriate Hartig net, with several entries in cells, is also shared with other pyroloids (Robertson and Robertson 1985; Massicotte et al. 2008). A pending question concerns the mechanism of C transfer from fungi to pyroloids. In our TEM analysis, host cytoplasm senesce before the fungal hyphae and, together with Robertson and Robertson (1985), we were not able to support the claim by Lück (1941) that any intracellular digestion of hyphae occurs. Digestion may thus not to be involved in fungus-to-plant C transfer, whereas this is a commonly invoked mechanism (Trudell et al. 2003). Further microscopic investigations are needed to assess this point.

A diverse but phylogenetically similar fungal diversity was recovered from the Kärle and Värška sites, dominated by ECM fungi (Tables 1 and 2). Since no additional cloning was performed for unsequenced samples and since sampling was limited to two sites, the results of the fungal community composition are not exhaustive. Broadening the geographical scope and linking it with ecological variables would certainly reveal more fungal diversity. Only four fungal species were already found on other pyroloids from Kärle studied by Tedersoo et al. (2007), including *Amphinema-Tylospora* sp. (AM181414-15 from *Chimaphila umbellata*), *Inocybe* sp.1 (AM181384 from *Orthilia secunda*) and *Tulasnella* sp.1 (AM181390 from *C. umbellata* and *O. secunda*). The moderate values of the Shannon diversity index at Kärle and Värška (Table 1) reflect the presence of many rare fungal taxa, detected only once in the study, in part due to the limited sampling size. The fungal richness after rarefaction and the Fisher's alpha value were higher for Värška than for Kärle (Table 1), but it is difficult to speculate on the reasons for this.

The taxa found on *P. rotundifolia* encompassed those identified on other pyroloids from European and Californian sites by Zimmer et al. (2007) and from Canada by Massicotte et al. (2008). This suggests that pyroloids

Fig. 3 Anatomy of *P. rotundifolia* mycorrhizae identified by ITS sequencing. **a** Transverse section of mycorrhizae formed by *Tomentella* sp.1, showing the large cortical cells (c) colonised by hyphae, the uncolonised central cylinder (cy), the Hartig net (n) and a dense hyphal mantle (m) as well as external hyphae (h). **b** Longitudinal section of an uncolonised, broken apex flanking a *Tomentella* sp.5 mycorrhiza with remains of root cap (rc), central cylinder (cy) and cortical cells (c). Note that the oldest uncolonised cortical cells have laterally positioned nuclei and tend to plasmolyse. **a**, **b** Light microscopy, bars=100 μ m. **c** Interface between a dense hyphal mantle (m) and cortical cells (c) in TEM of a *Russula* sp.3 mycorrhiza. Note non-collapsed, living hyphae in a dead host cell (dc); bar=50 μ m. **d** Detail of a hypha connecting the uniseriate Hartig net (n) and hyphal coils in cortical cells (c) from a *Russula* sp.1 mycorrhiza. **e** Detail of superficial hyphae (h) on a cortical cell (c) of a *Tulasnella* sp.1 mycorrhiza. **f** A tulasnelloid dolipore in a *Tulasnella* sp.1 mycorrhiza. **g** Bacteria (b) and intra-hyphal fungal colonisation (ic) in loose mantle hyphae of a *Hebeloma* sp.2 mycorrhiza. **d–g** TEM with bars=5 μ m



species tend to associate with similar fungal taxa. The diversity indices calculated from Tedersoo et al. (2007) at Kärle for other MX pyroloids correspond to the values found here (Table 1). Namely, Fisher's alpha values of the fungal community were 14.1 for *Orthilia secunda*, 10.9 for *Pyrola chlorantha* and 8.3 for *Chimaphila umbellata*, i.e. well in the range of the present study. In our previous analysis, we suggested that pyroloids possibly had a preference for *Tricholoma* spp., but Zimmer et al. (2007) challenged this. The present study rather supports the absence of apparent fungal preference in pyroloids, and few *Tricholoma* spp. were found (Table 1). A striking difference with our previous work at Kärle is that the relative abundance of ECM fungi versus simple endophytes is higher for *P. rotundifolia* than for other pyroloids. Cloning efforts in Tedersoo et al. (2007) most often revealed endophytic fungi in addition to ECM fungi, so that endophytes and ECM fungi were about equally

frequent in this previous study. The methodological option of the present study is sufficient to confirm a potential link to surrounding trees, but does not allow conclusions as to whether *P. rotundifolia* harbours more or less frequently ECM fungi than other pyroloids. Although direct in situ evidence is still lacking, the finding of a diverse ECM fungal community in the root of the strongly MX *P. rotundifolia* is in agreement with the idea that MX plants derive C from surrounding trees by way of shared mycorrhizal fungi (Selosse et al. 2006; Tedersoo et al. 2007; Zimmer et al. 2007).

The contrasting typing success in the two sites can be explained by time of sampling, differential preservation of samples or site effects affecting fungal colonization patterns. Similarly, Zimmer et al. (2007) reported strong differences in PCR success between sites. Given our standardised procedures, different preservation of the samples between the two sites is unlikely to explain the

more frequent multiple fungal colonisations at Värkska. Since roots were sampled 1 month later at this site, it may be that colonisation by endophytes progressively increases during the growing season due to a continuous recruitment from soil. Multiple fungal colonisations do occur on both sites in *P. rotundifolia* roots, as suggested (1) by samples for which direct sequencing of PCR product failed, (2) by some sequences whose chromatogram showed faint contamination by at least one other fungal ITS and (3) by the intra-hyphal growth (Fig. 3g) that may represent colonisation by other fungi. Indeed, a few fungi usually considered as root endophytes were found (Table 2), but in absence of anatomical data for these, we ignore whether they behave as true mycorrhizal fungi or as simple endophytes on *P. rotundifolia*. Poor physiological conditions of roots at time of sampling may also explain the abundance of endophytic fungi. Nevertheless, the success of direct sequencing was twice higher than that for *Chimaphila umbellata* root sampled at the same time on both sites (Selosse and Tedersoo, unpublished data). The fact that ITS of putative endophytes was directly amplified (Table 2) does not mean that they were sole root colonisers, since the mycorrhiza-forming fungus can remain hidden due to our primers sets. This applies to *Tulasnella* sp.1 whose ecology is unknown, although some *Tulasnella* spp. are ECM (Bidartondo et al. 2003; Tedersoo et al. 2008a, b). In this study, we were only able to document a loose interaction (Fig. 3f) in which TEM failed to demonstrate biotrophy due to poor tissue preservation. Similarly, to our knowledge, only one interaction between pyroloids and ascomycetes is reported at anatomical level (Robertson and Robertson 1985). The interactions between pyroloids and putatively endophytic fungi and ECM ascomycetes deserve further analyses. Selosse et al. (2007) hypothesised that endophytic ascomycetes (Helotiales) and basidiomycetes (sebacinoids) had been recruited as predominant mycorrhizal partners when ericoid mycorrhizae emerged in the other Ericaceae (Ericoideae and Vaccinioideae tribes) at time of their divergence from pyroloids and related species. In our study, *Helotiales* sp.1 and *Sebacina* (clade B) sp.1 belong to taxa that commonly form ericoid mycorrhizae (Smith and Read 1997; Selosse et al. 2007). Morphological analysis of their interaction with pyrolid roots, compared with their interaction with ericoid mycorrhizae, could allow reconstructing the features of the ancestral mycorrhizal association in Ericaceae.

Acknowledgements We thank Marie-Pierre Dubois and Violette Frennehardt for technical help in molecular work. U. Kõljalg and L. Tedersoo are funded by the Estonian Science Foundation (grants no. 6606, 7434, Gdhlm0092j; Rloomtipp) and M.-A. Selosse by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Société Française d'Orchidophilie. Molecular data used in this work were produced through molecular genetic analysis technical facilities of the IFR119 'Montpellier Environnement Biodiversité'.

References

- Abadie J-C, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P, Selosse M-A (2006) *Cephalanthera longifolia* (Neottiae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and non-photosynthetic individuals. *Can J Bot* 84:1462–1477 doi:10.1139/B06-101
- Berta G, Bonfante-Fasolo P (1983) Apical meristems in mycorrhizal and uninfected roots of *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *Plant Soil* 71:285–291 doi:10.1007/BF02182664
- Bidartondo MI, Bruns TD, Weiss M, Sergio C, Read DJ (2003) Specialized cheating of the ectomycorrhizal symbiosis by an epiparasitic liverwort. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:835–842 doi:10.1098/rspb.2002.2299
- Bidartondo MI, Burghardt B, Gebauer G, Bruns TD, Read DJ (2004) Changing partners in the dark: isotopic and molecular evidence of ectomycorrhizal liaisons between forest orchids and trees. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 271:1799–1806 doi:10.1098/rspb.2004.2807
- Gebauer G, Meyer M (2003) ^{15}N and ^{13}C natural abundance of autotrophic and myco-heterotrophic orchids provides insight into nitrogen and carbon gain from fungal association. *New Phytol* 160:209–223 doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00872.x
- Hashimoto Y, Kunishi A, Hasegawa S (2005) Interspecific C transfers from *Larix kaempferi* Carro *Pyrola incarnata* Fischer by way of mycorrhizal fungi. *Inoculum* 56:23–24 (supplement to Mycologia)
- Hobbie EA, Colpaert JV (2003) Nitrogen availability and colonization by mycorrhizal fungi correlate with nitrogen isotope patterns in plants. *New Phytol* 157:115–126 doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00657.x
- Julou T, Burhardt B, Gebauer G, Berviller D, Damesin C, Selosse M-A (2005) Mixotrophy in orchids: insights from a comparative study of green individuals and non-photosynthetic mutants of *Cephalanthera damasonium*. *New Phytol* 166:639–653 doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01364.x
- Kõljalg U, Larsson K-H, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U et al (2005) UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 166:1063–1068 doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01376.x
- Leake JR (2004) Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol* 7:422–428 doi:10.1016/j.pbi.2004.04.004
- Lück R (1941) Zur Keimung der heimischen Pirola-Arten. *Flora Jena* 135:1–5
- Massicotte HB, Melville LH, Tackaberry L, Peterson RL (2008) A comparative study of mycorrhizas in several genera of Pyroleae (Ericaceae) from western Canada. *Botany* 86:610–622 doi:10.1139/B08-027
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS variability in the Kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol Bioinfo* 4:193–201
- Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse M-A (2005) Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *New Phytol* 166:1011–1023 doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01382.x
- Robertson DC, Robertson JA (1985) Ultrastructural aspects of *Pyrola* mycorrhizae. *Can J Bot* 63:1089–1098 doi:10.1139/b85-150
- Selosse M-A, Weiß M, Jany J-L, Tillier A (2002) Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Mol Ecol* 11:1831–1844 doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01553.x
- Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci P, Bonfante P (2004) Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottiae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal

- septomycetes, including truffles. *Microb Ecol* 47:416–426 doi:[10.1007/s00248-003-2034-3](https://doi.org/10.1007/s00248-003-2034-3)
- Selosse M-A, Richard F, He X, Simard SW (2006) Mycorrhizal networks: *des liaisons dangereuses*? *Trends Ecol Evol* 11:621–628 doi:[10.1016/j.tree.2006.07.003](https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.07.003)
- Selosse M-A, Setaro S, Glatard F, Urcelayand C, Weiß M (2007) Sebacinaleae are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytol* 174:864–878 doi:[10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x)
- Smith SE, Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn. Academic, London
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycol Res* 109:661–686 doi:[10.1017/S095375620500273X](https://doi.org/10.1017/S095375620500273X)
- Tedersoo L, Kõljalg U, Hallenberg N, Larsson K-H (2003) Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytol* 159:153–165 doi:[10.1046/j.1469-8137.2003.00792.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00792.x)
- Tedersoo L, Pellet P, Kõljalg U, Selosse M-A (2007) Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Oecologia* 151:206–217 doi:[10.1007/s00442-006-0581-2](https://doi.org/10.1007/s00442-006-0581-2)
- Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I et al (2008a) Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytol* doi:[10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02561.x)
- Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, Kõljalg U (2008b) Forest microsite effects on community composition of ectomycorrhizal fungi on seedlings of *Picea abies* and *Betula pendula*. *Environ Microbiol* 10:1189–1201 doi:[10.1111/j.1462-2920.2007.01535.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01535.x)
- Trudell SA, Rygielwicz PT, Edmonds RL (2003) Nitrogen and carbon stable isotope abundances support the myco-heterotrophic nature and host-specificity of certain achlorophyllous plants. *New Phytol* 160:391–401 doi:[10.1046/j.1469-8137.2003.00876.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00876.x)
- Zeller B, Brechet C, Maurice J-P, Le Tacon F (2007) ^{13}C and ^{15}N isotopic fractionation in trees, soils and fungi in a natural forest stand and a Norway spruce plantation. *Ann For Sci* 64:419–429 doi:[10.1051/forest:2007019](https://doi.org/10.1051/forest:2007019)
- Zimmer K, Hynson NA, Gebauer G, Allen EB, Allen MF, Read DJ (2007) Wide geographical and ecological distribution of nitrogen and carbon gains from fungi in pyrolids and monotropoids (Ericaceae) and in orchids. *New Phytol* 175:166–175 doi:[10.1111/j.1469-8137.2007.02065.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02065.x)

De l'individu à l'espèce : structure génétique multi-échelles des populations du Basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria amethystina*

Résumé :

Les champignons ectomycorhiziens sont des symbiotes de la plupart des espèces d'arbres des forêts partout dans le monde, favorisant leur développement en leur apportant des nutriments du sol. Malgré leur importance écologique, les populations de ces espèces (généralement Basidiomycètes ou Ascomycètes) restent peu étudiées. Mes travaux de thèse s'intéressent à la génétique des populations du modèle *Laccaria amethystina*, Basidiomycète ectomycorhizien symbiote d'une gamme variée d'hôtes de forêts tempérées d'Europe et d'Asie, à des échelles spatiales variées. Au niveau local, un dispositif de suivi pluriannuel de populations a été mis en place, afin d'en décrire la dynamique spatio-temporelle et de comprendre la stratégie écologique de cette espèce. À des échelles plus larges, j'ai étudié la structure génétique spatiale des populations de *L. amethystina* en France (450 km), puis en Europe (2900 km) et de l'Europe à l'Asie (10000 km) pour en comprendre la biogéographie. Ces travaux ont révélé une population européenne panmictique, en partie due à la dispersion à grande distance des spores de reproduction sexuée, et un potentiel phénomène de spéciation cryptique au sein de *L. amethystina* entre l'Europe et le Japon. Ces résultats ouvrent la voie à des recherches ultérieures sur la structure génétique spatiale et temporelle des populations du genre modèle ectomycorhizien *Laccaria* spp.

Mots-clés : Ectomycorhize, génét, flux de gènes, isolement par la distance, phylogéographie, spéciation cryptique

From individual to species: multi-scales population genetic structure of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina*

Abstract:

Ectomycorrhizal fungi are symbiotic with most of forest tree species worldwide, and enhance their development by bringing them nutrients from the soil. Despite their major ecological role, populations of these species (mostly Basidiomycetes and Ascomycetes) remain poorly studied. My PhD work focuses on population genetics of the model ectomycorrhizal Basidiomycete *Laccaria amethystina*, symbiont of a large panel of host trees from European and Asian temperate forests, at various spatial scales. At the local resolution, a pluriannual survey of populations has been launched to describe their spatio-temporal dynamic and understand the ecological strategy of the species. At larger scales, I studied the spatial genetic structure of *L. amethystina* populations in France (450 km), then in Europe (2900 km) and from Europe to Asia (10000 km) to understand their biogeography. These works revealed a single, panmictic European population, partly due to long-distance dispersal of sexual spores, and a putative cryptic speciation phenomenon within *L. amethystina* between Europe and Japan. These results pave the way to further investigations on spatial and temporal genetic structure of the populations of the model ectomycorrhizal genus *Laccaria* spp.

Keywords: Ectomycorrhiza, genet, gene flow, isolation by distance, phylogeography, cryptic speciation