



HAL
open science

Etude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum* Pico) et de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.)

Claude Murat-Furminieux

► To cite this version:

Claude Murat-Furminieux. Etude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (*Tuber magnatum* Pico) et de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). Sylviculture, foresterie. Université Henri Poincaré - Nancy 1; Università degli studi di Torino, 2004. Français. NNT : 2004NAN10189 . tel-01776054

HAL Id: tel-01776054

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01776054>

Submitted on 24 Apr 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UMR INRA/UHP 1136 Interactions
Arbres/Micro-organismes, Centre INRA Nancy
(France)

Université Henri Poincaré- Nancy I,
UFR-Sciences et Techniques Biologiques
École doctorale RP2EVandoeuvre les Nancy

S.C.D. U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Dipartimento di Biologia Vegetale,
Università degli Studi di Torino
(Italia)

Thèse en Cotutelle

Présenté pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I
en Biologie Végétale et Forestière
et de
Docteur de l'Università degli Studi di Torino
en Biologie et Biotechnologie des champignons
Cycle XVII

Tesi in Cotutela

Presentata per l'ottenimento del titolo di
Dottore dell'Università Henri Poincaré, Nancy-I
in Biologia Vegetale e Forestale
e di
Dottore dell'Università degli Studi di Torino
in Biologia e Biotechnologia dei Funghi
Ciclo XVII

Claude Murat-Furminieux

**Etude de la diversité
génétique de la truffe blanche
du Piémont (*Tuber magnatum*
Pico) et de la truffe noire du
Périgord (*Tuber
melanosporum* Vittad.)**

**Studio della diversità
genetica del tartufo bianco
del Piemonte (*Tuber
magnatum* Pico) e del tartufo
nero del Perigord (*Tuber
melanosporum* Vittad.)**

Soutenance publique le 17 décembre 2004 / Presentazione finale il 17 dicembre 2004

Membres du Jury / membri della giuria :

Président / Presidente

M. Jean-Claude Debaud

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

Rapporteurs / Relatori

M. Jean-Claude Debaud

Mme Alessandra Zambonelli

Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

Prof.ssa, Università degli Studi, Bologna

Examineurs / Esaminatori

M. Gérard Chevalier

M. Simone Ottonello

M. Francis Martin

Mme Paola Bonfante

Chargé de recherche, INRA, Clermont-Ferrand

Professore, Università degli Studi, Parma

Directeur de Recherche, INRA, Nancy (Directeur de thèse / Tutor)

Prof.ssa Università degli Studi, Torino (Directeur de thèse / Tutor)

BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1



D 095 168299 7

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue de l'Université - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Ce travail a pu avoir lieu grâce à une bourse de thèse financée par le programme ISASUT de l'Università degli Studi di Torino.

Questo lavoro è stato realizzato grazie ad una borsa di dottorato finanziata dal programma ISASUT dell'Università degli Studi di Torino.

Table des Matières

TABLE DES FIGURES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE	7
TABLE DES ENCADRÉS DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	8
TABLE DES TABLEAUX DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE	8
REMERCIEMENTS.....	9
AVANT-PROPOS	10
1. INTRODUCTION GENERALE	12
1.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES TRUFFES : PLACE TAXONOMIQUE ET HISTORIQUE DES ÉTUDES RÉALISÉES CHEZ LES TRUFFES	16
1.1.1 <i>Mais que sont exactement les truffes ?</i>	16
1.1.2 <i>Donc, les truffes sont des champignons, mais quelle est leur place taxonomique ?</i>	17
1.1.3 <i>Depuis quand étudie-t-on les Tuber ?</i>	17
1.2 LES TRUFFES ET L'HOMME : PLACE DE LA TRUFFICULTURE DANS LA SOCIÉTÉ RURALE	24
1.2.1 <i>Quelles sont les intérêts des truffes et de la trufficulture?</i>	24
1.2.1.1 Intérêt gastronomique et culturel	24
1.2.1.2 Intérêt économique	25
1.2.1.3 Intérêt humain	27
1.2.1.4 Intérêt écologique.....	27
1.2.1.5 Intérêt de développement rural.....	27
1.2.2 <i>L'écologie des truffes : des connaissances indispensables pour les cultiver</i>	28
Caractéristiques écologiques de quelques espèces de <i>Tuber</i>	29
Interaction entre les <i>Tuber</i> et les champignons présents dans les truffières	30
Les bactéries et les truffes, une interaction semblant importante	31
Il existe aussi des levures vivant au contact des truffes	32
1.2.3 <i>La trufficulture, un problème vieux de plusieurs siècles</i>	32
1.2.3.1 <i>Tuber melanosporum</i> , la première truffe cultivée.....	32
Les premières expériences ont eu lieu en France	32
La France n'est pas le seul pays où la trufficulture est importante, c'est aussi le cas en Italie.....	33
Et l'Espagne ? (d'après Reyna dans <i>Le trufficulteur français</i> n°32 p10-14).....	33
Introduction de <i>T. melanosporum</i> dans des pays non producteurs naturellement ...	34
1.2.3.2 <i>Qu'en est-il pour les autres espèces ?</i>	35
Parmi les autres espèces de truffes cultivées, <i>T. uncinatum</i> l'est depuis plusieurs décennies.....	35
La blanquette (<i>T. borchii</i>), une autre truffe cultivée.	35
En revanche, la culture de <i>T. magnatum</i> n'est pas encore bien maîtrisée	36
1.3. BIOLOGIE DES TRUFFES.....	38

1.3.1 La phase saprotrophique.....	38
1.3.1.1 Le mycélium colonise-t-il un vaste espace ou est-il confiné aux alentours des racines ?.....	38
1.3.1.2 Réalisation de la phase saprotrophique <i>in vitro</i>	40
Quelle est la dynamique de croissance du mycélium de <i>Tuber</i> ?.....	40
1.3.1.3 Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de la phase saprotrophique?.....	41
Quelle est l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium ?.....	41
Un autre facteur qui influence la croissance des hyphes lors de la phase saprotrophique est la lumière.....	42
Quelles sont les sources de carbone que peut utiliser le mycélium de truffe pour croître ?.....	42
Quelles sont les voies métaboliques du carbone actives chez le mycélium de truffes lors de la phase saprotrophique?.....	42
Qu'en est-il pour l'assimilation de l'azote?.....	44
Quels sont les autres gènes importants exprimés lors de la phase saprotrophique?.....	46
1.3.2 La phase symbiotique.....	47
1.3.2.1 Généralités sur les mycorhizes.....	47
Que sont les mycorhizes ?.....	47
Quel peut-être le rôle des mycorhizes dans les écosystèmes ?.....	49
1.3.2.2 Les truffes, des champignons ectomycorhiziens.....	50
1.3.2.3 Comment le mycélium reconnaît-il la racine et entre en phase symbiotique = phase pré-symbiotique?.....	51
Mais quels sont les signaux permettant à la truffe de reconnaître la plante?.....	52
Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase pré-symbiotique ?.....	53
1.3.2.4 La morphologie des mycorhizes dépend de la souche et de l'hôte.....	54
1.3.2.5 Quels sont les mécanismes moléculaires et biochimiques présents lors de la phase symbiotique des <i>Tuber</i> ?.....	54
Le métabolisme du carbone chez l'ectomycorhize.....	54
Métabolisme azoté de la phase symbiotique.....	55
Expression des enzymes de la voie d'assimilation de l'azote.....	55
Sous quelle forme l'azote est-il transféré du champignon à la plante ?.....	55
Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase symbiotique ?.....	55
1.3.2.6 Les <i>Tuber</i> sont-ils capables de former d'autres types de mycorhizes ?.....	57
1.3.3 La phase reproductive.....	59
1.3.3.1 Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?.....	59
1.3.3.2 Comment l'ascocarpe trouve ses nutriments ?.....	61
1.3.3.3 Le métabolisme carboné chez l'ascocarpe.....	61
1.3.3.4 Le métabolisme azoté.....	61
1.3.3.5 Quels sont gènes exprimés lors de la différenciation de l'ascocarpe ?.....	62
1.3.4 En fait, il persiste des doutes sur le cycle biologique des truffes.....	64
1.4 LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE : DE L'IDENTIFICATION DES ESPÈCES À LA PHYLOGÉOGRAPHIE.....	66
1.4.1 Variabilité génétique et génétique des populations.....	66
1.4.1.1 Concepts généraux et définitions.....	66
La génétique des populations, une discipline en plein essor.....	66
La variabilité génétique ou polymorphisme : l'outil des études de génétique des populations.....	66
Comment révéler la variabilité génétique ?.....	3
Quelles sont les origines et les causes de l'évolution de la variabilité génétique.....	67

1.4.1.2 Pourquoi étudier la variabilité génétique ?	70
La variabilité génétique comme outil d'identification des espèces	70
La conservation des espèces	71
Co-évolution entre les espèces	72
La diversité génétique comme outil d'étude des communautés : exemple des champignons ectomycorhiziens	72
Subdivision des populations et structure génétique.....	74
La diversité génétique peut permettre d'avoir des informations sur l'histoire d'une espèce.....	75
Comment peut-on révéler ces facteurs ?.....	75
1.4.2 Les nouveaux outils d'identification des <i>Tuber</i>	78
1.4.2.1 Méthodes Biochimiques.....	79
Analyse des protéines totales.....	79
Analyse des Isoenzymes	80
1.4.2.2 Méthodes moléculaires.....	82
Méthodes d'amplification aléatoire	82
Analyse moléculaire par PCR dirigée.....	84
Existe-t-il encore des espèces de truffes qui soient difficiles à séparer ?.....	85
1.4.3 Que sait-on sur la diversité intraspécifique et sur la structure génétique des <i>Tuber</i> ?	87
Existe-t-il une différenciation génétique entre les populations de truffes ?	88
LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	93
RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION GÉNÉRALE	94
2. RESULTATS.....	102
2.1 ETUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TRUFFE NOIRE DU PÉRIGORD, <i>TUBER</i> <i>MELANOSPORUM VITTAD.</i>	104
2.2 ETUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TRUFFE BLANCHE DU PIÉMONT, <i>TUBER</i> <i>MAGNATUM PICO</i> : EXEMPLE DE LA TRUFFIÈRE NATURELLE DE MONTEMAGNO (ASTI, ITALIE).....	116
2.3 IDENTIFICATION DES MYCORHIZES DE <i>T. MAGNATUM</i> ET DES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS DANS LA TRUFFIÈRE DE MONTEMAGNO (ASTI, ITALIE).	128
3. DISCUSSION GENERALE.....	140
3.1 DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE ET STRUCTURE GÉNÉTIQUE CHEZ <i>T. MELANOSPORUM</i> ET <i>T.</i> <i>MAGNATUM</i>.....	143
3.1.1 L'ITS, un locus polymorphe chez les truffes.....	143
3.1.2 Mise en évidence d'une structure génétique chez <i>T. melanosporum</i> et <i>T.</i> <i>magnatum</i>	145
3.1.3 Phylogéographie des truffes	146
Quels sont les principaux refuges et les principales voies de recolonisation post- glaciaire en Europe?.....	147
Qu'en est-il pour <i>T. melanosporum</i> ?	147

Qu'en n'est-il pour les autres espèces de <i>Tuber</i> ?.....	149
3.2 ANALYSE D'UNE TRUFFIÈRE DE <i>T. MAGNATUM</i>.....	150
3.2.1 <i>La diversité génétique au sein de la truffière</i>	151
3.2.2 <i>Que se passe-t-il dans le sous-sol de la truffière ?</i>	152
Identification de mycorhizes de <i>T. magnatum</i>	152
Biodiversité ectomycorhizienne au sein de l'écosystème truffier	152
3.3 LIMITES RENCONTRÉES PAR L'ANALYSE DE <i>T. MELANOSPORUM</i> ET <i>T. MAGNATUM</i> ET CONSÉQUENCES POUR LA FILIÈRE TRUFFE.....	154
RÉFÉRENCES DE LA DISCUSSION GÉNÉRALE	155

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
 Rue du Jardin botanique - BP 11
 54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Table des Figures

Figures de la discussion générale

1.	Schéma présentant les quatre grandes parties de l'introduction.	p. 14
2.	Arbre phylogénétique des Pezizales établi à partir de la séquence nucléotidique de l'ADNr 18S.	p. 19
3.	Ascocarpes (A) et spores (B) de quelques espèces de truffes.	p. 23
4.	Facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer la vie des truffes.	p. 28
5.	Cycle biologique des <i>Tuber</i> .	p. 39
6.	Courbes de croissances de quelques espèces de <i>Tuber</i> .	p. 41
7.	Schéma de la glycolyse.	p. 43
8.	Voies d'assimilation de l'azote inorganique chez les champignons.	p. 45
9.	Anatomie microscopique de quelques types de mycorhizes : (a) ectomycorhize, (b) endomycorhize arbusculaire ; (c) endomycorhize à pelotons ericoïdes.	p. 48
10.	Echanges moléculaires intervenant dans la rhizosphère lors de la colonisation d' <i>Eucalyptus globulus</i> par <i>Pisolithus</i> .	p. 51
11.	Accumulation de la protéine TbSP1 en condition de carence nutritionnelle dans le mycélium de <i>T. borchii</i> .	p. 53
12.	Immunocytolocalisation de la protéine TbSP1 à l'or dans les hyphes du mycélium de <i>T. borchii</i> .	p. 53
13.	Stades de développement de l'ectomycorhize et expression des gènes impliqués dans les différentes phases de l'interaction symbiotique des <i>Tuber</i> .	p. 57
14.	Ascocarpes de <i>T. maculatum</i> produits en pots avec <i>Pinus strobus</i> .	p. 60
15.	Les différentes phases du développement de l'ascocarpe de <i>T. melanosporum</i> .	p. 60
16.	Causes de l'évolution : description des différentes forces évolutives.	p. 69
17.	Schéma représentant les principales causes de l'extinction des espèces.	p. 71
18.	Facteurs à l'origine de la différenciation génétique.	p. 76
19.	Dendrogramme UPGMA, généré avec les distances génétiques de Nei, montrant les relations entre les 20 types enzymatiques et permettant de séparer 7 taxons de <i>Tuber</i> .	p. 81
20.	Arbre Neighbour-Joining obtenu avec les amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de <i>T. uncinatum</i> et <i>T. aestivum</i> .	p. 83
21.	Dendrogramme UPGMA réalisé sur 11 taxons de <i>Tuber</i> à l'aide de la RAPD.	p. 87
22.	Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) construit à partir de la matrice des distances (coefficient de similarité de Nei) établie à partir des profils RAPD de 82 ascocarpes de <i>Tuber melanosporum</i> .	p. 88

23. Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) avec des amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de *T. uncinatum* et *T. aestivum*, les origines géographiques sont indiquées. p. 90

24. Schéma de conclusion de l'introduction générale.

Figures de la discussion générale

25. Mécanisme pouvant expliquer l'existence de plusieurs haplotypes de l'ITS chez les truffes. P. 148

26. Les trois principaux types de recolonisation post-glaciaire de l'Europe. p. 151

27. Distribution des 10 haplotypes ITS de *T. melanosporum* dans les 17 populations analysées. p. 152

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

Table des Encadrés de l'Introduction générale

1.	Extraits des observations sur la végétation des truffes de Claude Joseph Geoffroy en date du 25 février 1711 dans le volume annuel de l'Histoire de l'Académie royale des Sciences.	p. 20
2.	Adolphe Chatin est très connu des trufficulteurs car il a écrit un ouvrage de référence sur la production des truffes, le texte qui suit décrit la vie de ce scientifique.	p. 21
3.	Menu servi lors du dîner truffes à la présidence du Sénat le 13 février 2002 et préparé pour le président Christian Poncelet par l'équipe de cuisiniers dirigée par un lotois, M. Mathou.	p. 25
4.	Comment définir le terme de population ?	p. 67
5.	Que sont les espèces ?	p. 70
6.	Extrait du livre de Darwin : « <i>Origin of Species</i> » p95 1 ^{ère} édition.	p. 72
7.	Niveau de structuration génétique basé sur les valeurs de <i>Fst</i> .	p. 74
8.	Définition de phylogéographie.	p. 75
9.	La théorie de la coalescence : une approche rétrospective.	p. 76-77
10.	<i>T. aestivum</i> Vittad. et <i>T. uncinatum</i> Chatin deux taxa très discutés.	p. 86

Table des Tableaux de l'Introduction générale

1.	Les espèces de truffes européennes pouvant être commercialisées en France et en Italie.	p. 16
2.	Comparaison de la classification des ordres des Tuberales et des Pezizales issus de l'analyse morphologique avec l'ordre des Pezizales issu de l'analyse moléculaire.	p. 18
3.	Bilan des campagnes truffières françaises de 1990 à 2002 (Estimations faites pour <i>T. melanosporum</i>).	p. 26
4.	Quelques caractéristiques écologiques de <i>Tuber uncinatum</i> , <i>T. magnatum</i> et <i>T. melanosporum</i> .	p. 29
5.	Caractéristiques physicochimiques des sols de truffières de <i>T. melanosporum</i> et <i>T. uncinatum</i> .	p. 30
6.	Caractéristiques sommaires des principaux types de mycorhizes.	p. 48
7.	Estimation de la biomasse fongique (dosage de l'ergostérol) et du taux de transcrit fongique (ARNr) dans l'ectomycorhize <i>T. borchii-Tilia platyphyllos</i> obtenu <i>in vitro</i> .	p. 56
8.	Principales méthodes moléculaires utilisées en écologie.	p. 68
9.	Amorces spécifiques de quelques espèces de <i>Tuber</i> , cette liste n'est pas exhaustive.	p. 85

REMERCIEMENTS

Je commencerai par remercier mes deux directeurs de thèse : Paola Bonfante et Francis Martin pour leur disponibilité et leurs nombreux conseils. Je voudrais aussi leur faire part de ma plus grande gratitude pour m'avoir permis de réaliser cette thèse en cotutelle qui fut une expérience très enrichissante aussi bien professionnellement que personnellement...

Je tiens à remercier tout particulièrement Gérard Chevalier, sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu, Jesus Diez, qui est à l'origine des analyses statistiques, Chantal Dupré, qui a réalisé un bon nombre d'extractions d'ADN et de PCR, Christine Delaruelle, qui a fait beaucoup de séquences, Alessandra Pachi, qui m'a guidé lors de mon inscription à l'université de Turin, Marina pour m'avoir trouvé pas mal d'articles anciens, Nini Foureyson pour les corrections d'orthographe et Antonietta Mello.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail : François Buscot, Virgilio Gavazza et son oncle (sans oublier le Chien Judy), Patricia Luis, Roland Marmeisse, Martina Peter, Elisabetta Peccorella, Matteo Cagnasso, Alfredo Vizzini, Mirco Iotti, Alessandra Zambonelli et tous les trufficulteurs qui ont fourni les échantillons indispensables à cette étude.

Durant ce travail, j'ai croisé la route de nombreuses personnes qui ont toutes été importantes, je m'excuse d'ores et déjà des oublis... Richard Splivallo, Marta Pitet, Stefania Daghino, Gilda Cappellazzo, Luisa Lanfranco, Stefano Ghignone, Cristina Mariani,, Mariangela Girlanda, Raffaella Balestrini, Valeria Bianciotto, Anamaria Cantisani, Daniella Minerdi et Andrea, Andrea Genre, Cinzia Berteza (alias Santa Cinzietta di SSDP), Simona Abbà, Alessandra Salvioli, Silvia Gabella, Antonella Faccio, Erica Lumini, Mara Novaro, Mohammed, Caroline, Sara Torrielli, Silvia Perotto, Pierre-Emmanuelle Courty, Annegret Kohler, Joanne Bertaux, Sébastien Duplessis, Dominique Vairelle, Nicole Thirion, Claude Coppin, Beatrice Palin, Karen Bertaux, Yongjin Wang, Anne Jambois, David Cohn et bien d'autres que je salue !

Merci à :
 - Marc Buée pour avoir passé plusieurs jours sur le canapé à cause de moi.
 - Mirco Iotti et Barbara Montanini de m'avoir logé lors de mes séjours à Modena et Reggio-Emilia.
 - Patricia Luis et Patrick Frettinger pour cette belle semaine à Jena.
 - Et bien sûr à Jean-Luc Jany pour ce très beau séjour à Québec... au moment où j'écris ces remerciements le TFC est premier.... Tu dois être content !

Merci aussi à Marc-André Selosse pour ses nombreux conseils.

Grazie à Gladstone Silva et Alessandra Benedetto pour avoir partagé palazzo avec moi, mais aussi et surtout merci à Sandra pour cette nuit passée à l'hôpital...

Merci à Marta Vallino pour m'avoir initié à la cuisine Piémontaise, bagna cauda, et avoir partagé cette grande table en microscopie.... Je pense que ce fut difficile pour toi de reconnaître la supériorité des français... 😊

Un coucou particulier à ma partenaire préférée du café (j'ai déjà vu cette phrase quelque part... 😊), Laura Miozzi, qui a su m'écouter quand j'en avais besoin...

Je tiens à remercier Mr Bruelle (mon professeur de Biologie au collège et au lycée) qui a su m'initier au monde de l'ADN ; et David Larnaud, mon compère du lycée.

Un petit salut à Yohann qui sera toujours mon meilleur collègue... Merci aussi pour ton hospitalité à Paris !

Je ne veux pas oublier mes parents, Josette et Dédé (à ne pas gratter 😊), merci de m'avoir laissé faire ce que j'ai voulu même lorsque ma vie était agitée.

Ah oui! J'allais oublier...merci paciucchina pour.....tout ! Pour plus de clarté Paciuchina : Elena Martino.

Avant-propos

Les truffes : depuis toujours un Mythe !

Depuis longtemps la truffe intrigue, sa nature a toujours été mystérieuse. Dans l'Antiquité, les Grecs et les Romains lui prêtaient des vertus thérapeutiques et aphrodisiaques, pouvoirs qu'on lui reconnaissait encore au XIX^e siècle. Alexandre Dumas disait :

« Elle peut, en certaines occasions, rendre les femmes plus tendres et les hommes plus aimables ».

Les superlatifs qui lui sont attribués témoignent de sa valeur presque mythique: "Diamant de la Cuisine" (Brillat-Savarin), "Pomme féérique" (George Sand), "Négresse Reine" (Émile Goudeau), "Gemme des Terres pauvres" (Colette), "Perle noire" (Fulbert Dumontei). En littérature, il en est de même, je citerai l'exemple du roman d'Anne et Serge Golon, Angélique Marquise des Anges :

« C'est un ragoût de truffes vertes, Madame, venues toutes fraîches du Périgord. Sachez que la truffe est divine et magique. Il n'y a pas de mets plus recherché pour préparer le corps d'une épousée à recevoir les hommages de son mari. La truffe fait l'entraille chaleureuse, le sang vif et rend la peau facilement émue aux caresses. »

Alors, a-t-elle réellement autant de pouvoirs ?

La réponse est loin d'être établie, mais comme l'a écrit Brillat-Savarin, célèbre cuisinier du XVIII^e :

"Alors continuons d'y croire et surtout d'en manger".

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

1. INTRODUCTION GENERALE

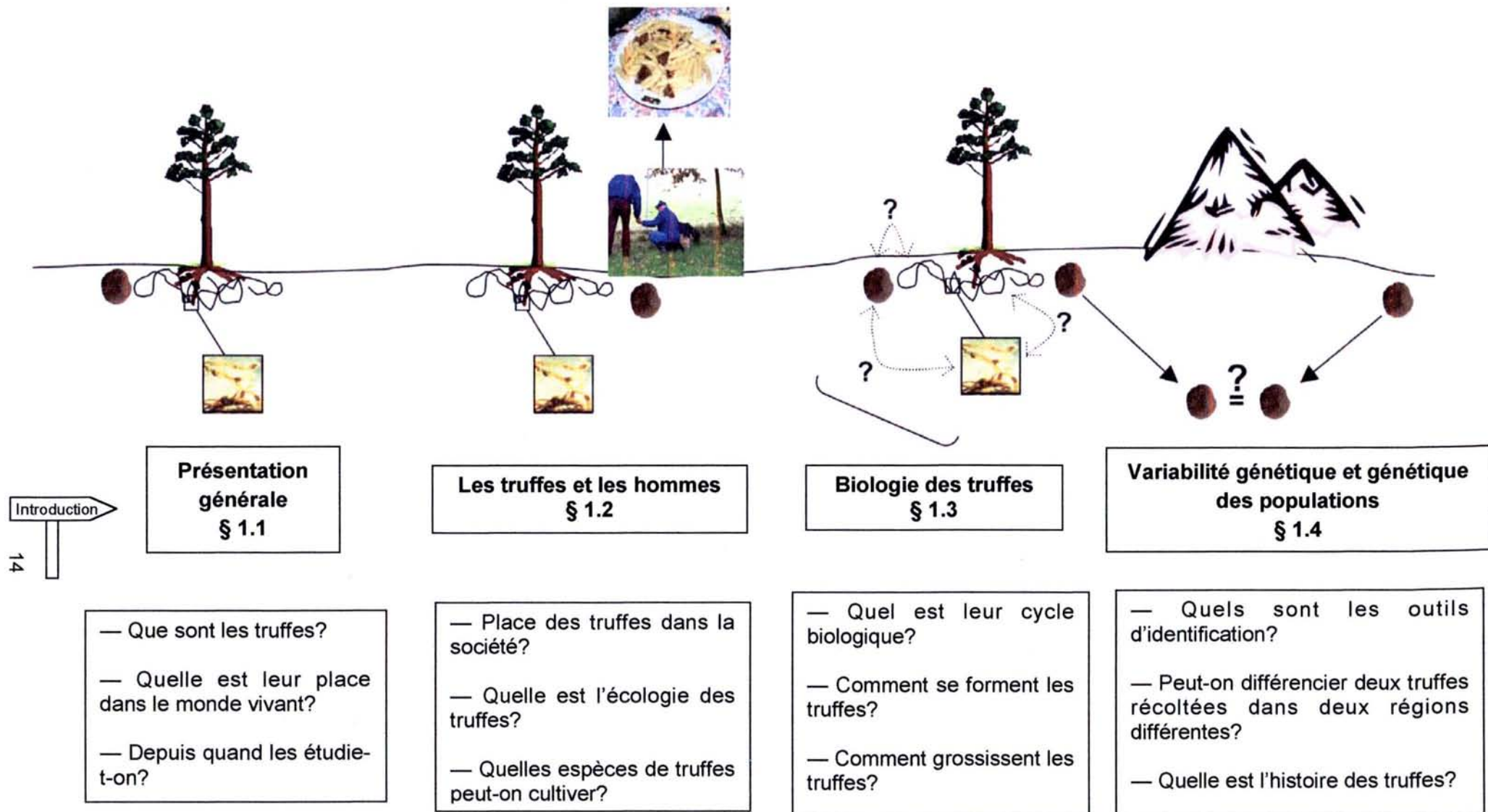


Figure 1. Schéma présentant les quatre grandes parties de l'introduction. Pour chaque partie, j'ai reporté les principales questions que se posent les chercheurs, les trufficulteurs et les consommateurs. Tout au long de notre parcours dans le monde des truffes nous allons essayer de répondre à ces questions et de faire une mise au point des connaissances actuelles sur les truffes. **Comme nous le verrons ultérieurement, mon travail de thèse se focalisera surtout sur la dernière partie de l'introduction relative à la diversité génétique des *Tuber*.**

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE SCIENCES
Rue du Jardin Botanique - BP 11
54601 VILLERS-LES-NANCY Cedex

1.1 Présentation générale des truffes : place taxonomique et historique des études réalisées chez les truffes

Comme nous l'avons vu en avant-propos, la truffe semble avoir beaucoup de pouvoirs. Mais que sont exactement les truffes ? Nous commencerons cette introduction par les présenter, nous verrons leur place dans le monde vivant et ferons un bref historique des études portant sur les truffes depuis plusieurs siècles.

1.1.1 Mais que sont exactement les truffes ?

Nous savons qu'elles sont connues depuis plusieurs millénaires puisqu'un texte de 1600 avant J.C. les décrit comme étant des produits mystérieux de la terre (Miozzi, 2003). Dans l'Antiquité, Théophraste (III^e siècle av. J-C) les voyait comme des produits des pluies d'orages, Nicandre (II^e siècle av. J-C) comme du limon modifié par la chaleur du centre de la terre, Dioscoride (I^{er} siècle av. J-C) comme des racines, Pline l'ancien (I^{er} siècle ap. J-C) comme des tumeurs ou callosités de la terre et Plutarque (45-125) comme étant dus à l'action de la pluie, du tonnerre et de la chaleur (Callot, 1999 ; Rioussset et al., 2001).

Depuis Cesalpino (1583), nous savons que les truffes sont des champignons ayant des fructifications hypogées.

Dans le monde, il existe une soixantaine d'espèces de truffes (Trappe, 1979) dont une vingtaine présentes en Europe (Gandeboeuf, 1997 ; Rioussset et al., 2001). Les qualités organoleptiques de certaines d'entre elles sont très appréciées par les consommateurs, il a donc été nécessaire de réglementer leur commercialisation. En Italie, les espèces pouvant être vendues sont définies par la loi n. 752 du 16 décembre 1985, modifiée le 17 mai 1991 (n. 162) (Tableau 1).

Tableau 1. Les espèces de truffes européennes pouvant être commercialisées en France et en Italie (d'après Dupré, 1997).

Les truffes noires	
Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Tuber aestivum</i> Vittad.	Truffe d'été
<i>Tuber brumale</i> Vittad. ou <i>T. brumale</i> Vittad. var. <i>moschatum</i> Ferry	
<i>Tuber macrosporum</i> Vittad	
<i>Tuber mesentericum</i> Vittad	Truffe mésentérique
<i>Tuber melanosporum</i> Vittad	Truffe noire du Périgord
<i>Tuber uncinatum</i> Vittad	Truffe de Bourgogne
Les truffes blanches	
Nom scientifique	Nom vernaculaire
<i>Tuber magnatum</i> Pico	Truffe blanche du Piémont
<i>Tuber borchii</i> Vittad	Blanquette

Parmi celles-ci se trouvent les champignons les plus chers au monde, entre autres, *T. melanosporum* s'est vendue 480 €/Kg durant la saison 2000-2001 (Le trufficulteur français n°37, p21). Mais l'espèce de truffe la plus chère est *T. magnatum*, puisque ses cours étaient en octobre 2001 de 7000 €/Kg pour les truffes de 20 à 40 g et de 8000 €/Kg pour celles de plus de 40 g (Le trufficulteur français n°36, p22). Nous reviendrons au paragraphe 1.2.1.2 sur l'importance économique des truffes.

1.1.2 Donc, les truffes sont des champignons, mais quelle est leur place taxonomique ?

En fait, les truffes sont des Ascomycètes, c'est-à-dire que leurs spores sont produites dans des sortes de sacs : les asques. Elles font partie des Discomycètes au sein des Eufungi (RiOUSSET et al., 2001). Les analyses morphologiques et les similitudes de formes rencontrées pour les ascocarpes hypogés ont conduit à les classer, dans un premier temps, avec d'autres champignons hypogés comme les Terfeziaceae, dans un ordre distinct des Pezizales : l'ordre des Tubérales (Tableau 2).

Mais, Trappe (1979) a considéré cet ordre comme étant « artificiel et anachronique » et a intégré la famille des Tuberaceae dans l'ordre des Pezizales. Des études plus récentes de biologie moléculaire réalisées sur les ordres des Tubérales et des Pezizales et portant sur les régions 18S et 28S de l'ADN ribosomique ont confirmé les conclusions de Trappe (1979) en montrant que l'ordre des Tubérales n'avait pas de raison d'exister (Figure 2 et Tableau 2; O'Donnell et al., 1997 ; Percudani et al., 1999).

Donc, le genre Tuber fait maintenant partie de la famille des Tuberaceae classées dans l'ordre des Pezizales.

1.1.3 Depuis quand étudie-t-on les *Tuber* ?

C'est au XVI^e siècle que les premiers travaux importants concernant les truffes ont été réalisés. Mattioli (1554) fait allusion pour la première fois à deux espèces de truffes comestibles et, comme nous l'avons déjà dit précédemment, Cesalpino (1583) est le premier à les reconnaître comme des champignons dans son livre « *De plantis XVI* ». Au XVII^e siècle, l'Anglais John Ray dans deux ouvrages : « *Historia plantarum* » (1686) et « *Synopsis methodica* » (1690) décrit 184 espèces fongiques et identifie de véritables graines dans la truffe. Le XVIII^e siècle voit les études se multiplier et, en 1711, le français Claude Joseph Geoffroy réalise une description très détaillée des truffes (Encadré 1). Il reconnaît les veines qui parcourent la pulpe et observe les graines de la truffe.

Tableau 2. Comparaison de la classification des ordres des Tuberales et des Pezizales issus de l'analyse morphologique (Dennis, 1981) avec l'ordre des Pezizales issu de l'analyse moléculaire (O'Donnell et al., 1997; Percudani et al., 1999). Les genres qui sont soulignés correspondent à des positions systématiques incertaines (d'après Miozzi, 2003).

Classification suivant Dennis, 1981		Classification suivant O'Donnell et al., 1997 et Percudani et al., 1999	
Ordre Pezizales		Ordre Pezizales	
Famille	Genre	Famille	Genre
Morchellaceae	Morchella <i>Mitrophora</i> <i>Varpa</i> <i>Disciotis</i>	Morchellaceae	Morchella <i>Mitrophora</i> <i>Verpa</i>
Helvellaceae	<i>Gyromitra</i> <i>Helvella</i> <i>Leptopodia</i> <i>Macroscyphus</i> <i>Cyathipodia</i> <i>Paxina</i> <i>Rhizina</i> <i>Discina</i>	Helvellaceae	<i>Helvella</i> <i>Balsamia</i> <i>Hydnobolites</i>
Pezizaceae	<i>Plicaria</i> <i>Sarcosphaera</i> <i>Peziza</i> <i>Pachyella</i>	Pezizaceae	<i>Plicaria</i> <i>Sarcosphaera</i> <i>Peziza</i> <i>Pachyella</i> <i>Terfezia</i> <i>Pachyphloeus</i>
Humariaceae			
Ordre Tuberales			
Famille	Genre		
Pseudotuberaceae	<u>Gyrocratera</u> <i>Hydnobolites</i>		
Geneaceae	<i>Genea</i>	Geneaceae	<i>Genea</i>
Eutuberaceae	<i>Stephensia</i> <i>Pachyphloeus</i> <i>Balsamia</i> <i>Tuber</i>	Tuberaceae	<i>Tuber</i> <i>Choiromyces</i>
Terfeziaceae	<u>Hydnobolites</u> <i>Choiromyces</i> <i>Terfezia</i>		

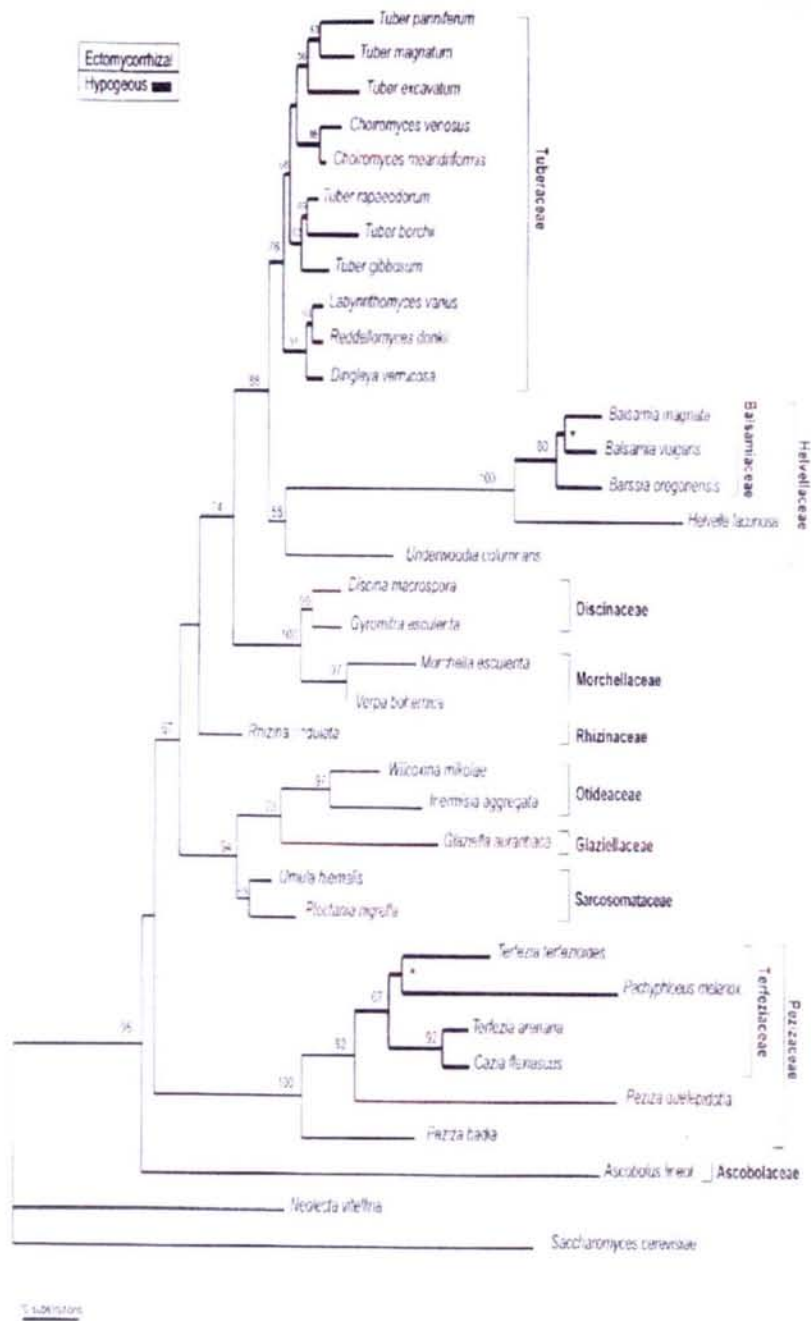


Figure 2. Arbre phylogénétique des Pezizales établi à partir de la séquence nucléotidique de l'ADNr 18S (Percudani et al., 1999).

Encadré 1. Extraits des observations sur la végétation des truffes de Claude Joseph Geoffroy en date du 25 février 1711 dans le volume annuel de l'Histoire de l'Académie royale des Sciences (d'après Le trufficulteur français n°37 p27-28):

« ...Cette forme de plante n'est qu'un tubercule charnu couvert d'une espèce de croûte dure, chagrinée et gercée à sa superficie, avec quelque sorte de régularité, telle à peu près qu'on l'aperçoit dans la noix de cyprès ... »

« ...Ce qui est certain c'est qu'il y en a de fort grosses. Elles naissent en différents pays. Du temps de Pline, les plus estimées étaient apportées d'Afrique. On en trouve à présent en Europe, dans le Brandebourg et en plusieurs autres endroits d'Allemagne [...] Elles sont communes en Italie, en Provence, en Dauphiné, dans le Languedoc, l'Angoumois et le Périgord. Il en croît aussi en Bourgogne et on en trouve aux environs de Paris. On remarque qu'elles viennent plus ordinairement dans des sols incultes, de couleur rougeâtre et sablonneux, quoiqu'un peu gras. On en trouve au pied et à l'ombre des arbres. On les trouve aussi quelquefois entre des racines, des pierres et quelquefois en pleine terre. Leur arbre favori est le chêne, ou le chêne vert, ou le chêne blanc. Comme l'orme est celui de la morille... »

« ...Elles ne paraissent dans leur naissance que comme des petits pois ronds, rouges en dehors et noirs en dedans. Ces pois grossissent peu à peu. C'est depuis ce temps-là qu'on commence à tirer de la terre, celles que l'on nomme truffes blanches [...] C'est l'opinion commune que les truffes qui ont été déplacées ne prennent plus de nourriture, quand même on les remettrait dans la même terre d'où on les a tirées ; mais si on les y laisse jusqu'à un certain point sans les déranger, elles grossissent insensiblement, leur écorce devient noire et chagrinée ou inégale, quoiqu'elles conservent toujours leur blancheur au-dedans : jusqu'à ce point, elles ont très peu d'odeur et de saveur, et ne peuvent encore s'employer qu'en ragoût... »

« ... Je considère la truffe blanche dans son premier état comme une plante qui est tout à la fois racine, tige et fruit dont le parenchyme se gonfle de toute part et dont les parties se développent insensiblement. À mesure que la truffe se gonfle, l'écorce se durcit, se gerce en différents endroits pour donner plus de nourriture à la masse qui est plus grosse, alors la truffe change de couleur et de blanche qu'elle était, on la voit se marbrer de gris et on n'aperçoit plus le blanc que comme un tissu de canaux qui se répandent dans le cœur de la truffe et qui viennent rendre aux gerçures de l'écorce... »

« ...l'odeur de la truffe ne dépend que de la grande quantité de sel volatil huileux qu'elle contient... »

Vingt ans plus tard, Micheli (1729) est le premier à dessiner les graines et il introduit le mot *Tuber* dans son livre « *Nova plantarum genera* ». En 1788, Vittorio Pico, médecin Turinois, fournit les bases de la nomenclature des Tuberales dans un ouvrage intitulé « *Melethemata inauguralia* ». Au XIX^e, siècle, Vittadini (1831) publie « *Monographia Tuberales* » dans lequel il recadre la systématique des truffes. Il est le premier à différencier deux groupes de *Tuber* en se basant sur les caractères extérieurs : (i) chair relativement tendre, saveur agréable et bonne qualité gustative ; (ii) chair coriace, saveur désagréable et mauvaise qualité gustative. Les frères Tulasne publient en 1862 un livre sur les champignons hypogés, « *Funghi hypogaei* », dans lequel ils présentent la première classification scientifique mais aussi pratique des truffes. Ils utilisent pour la première fois des critères microscopiques. Chatin (1887) subdivise l'espèce *T. aestivum* de Vittadini en deux taxons distincts : *T. uncinatum* Chat. et *T. aestivum* Vitt. ; subdivision encore discutée, nous y reviendrons ultérieurement (Encadré

10). Ce même Chatin (1869, 1892) donne les conditions générales de la production des truffes et de la biologie des Tuberaceae (Encadré 2).

Encadré 2. Adolphe Chatin est très connu des trufficulteurs car il a écrit un ouvrage de référence sur la production des truffes, le texte qui suit décrit la vie de ce scientifique (d'après Le trufficulteur français n°45 p4) :

Chatin est né le 30 novembre 1813, à l'Île-Marianne-de-Saint-Quentin, près de Tullins, en Isère. Fils de cultivateurs, il ne possédait qu'un simple bagage primaire et des éléments de latin, lorsqu'il entra dans l'officine Lombard, à Saint-Marcellin, avant d'être recommandé par le pharmacien à un confrère parisien qui avait noté sa vive intelligence. Grâce à l'appui matériel de ce dernier, Chatin obtenait l'agrégation de pharmacie en 1841 et le poste de suppléant de botanique à l'École de pharmacie.

Il en détenait la chaire en 1848 après avoir obtenu le maintien du ministre de l'instruction publique, Hippolyte Carnot. En 1869, il écrit un premier ouvrage intitulé *La truffe*. Devenu Directeur de l'École de pharmacie, en 1873, il fut l'artisan de son transfert, avenue de l'Observatoire à Paris, en 1881.

Botaniste émérite, il joua un rôle déterminant dans la rénovation de l'enseignement pharmaceutique. Il a pendant 60 ans disséqué les plantes, étudié leur origine, leur structure, leur tissu, leur respiration, leur pigmentation. En 1887, il décrit une nouvelle espèce de truffe : *Tuber uncinatum* et en 1892 il écrit un deuxième livre : *La truffe. Botanique de la truffe et des plantes truffières*. Il est mort en 1901.

Au début du XX^e siècle, Mattiolo de l'« Orto Botanico » de Turin approfondit le concept de symbiose mycorhizienne et la possibilité de cultiver les truffes, anticipant ainsi les résultats obtenus dans les années 70, nous y reviendrons au paragraphe 1.2.3. Il faut ensuite attendre 1938 pour voir Malençon donner une nouvelle clef analytique consacrée à la systématique des *Tuber*. En 1960, l'« Orto Botanico » de Turin revient au premier plan avec le livre d'Arturo Ceruti: « *Elaphomycetales e Tuberales* ».

D'autres travaux ont ensuite été réalisés sur la classification et la systématique des truffes principalement en Italie (Pacioni, 1988 ; Pacioni et Pomponi, 1989, 1991 ; Pacioni et Fantini, 1997 ; Montecchi et Lazzari, 1993 ; Ceruti et al., 2003) et en France (Chevalier et al. 1985; Rioussset et Rioussset, 1988, 1990, 1993 ; Chevalier et al., 1994 ; Henrion et al., 1994). D'autres pays européens se sont aussi intéressés aux truffes : la Suisse (Schärzel, 1967), l'Allemagne (Gross, 1987), la Hollande (De Vries, 1971, 1977), la Belgique (Thöen, 1988), le Danemark (Lange, 1956), l'Angleterre (Hawker, 1954 ; Pegler et al., 1993), la Hongrie (Szmere, 1965) ; mais cette liste n'est pas exhaustive.

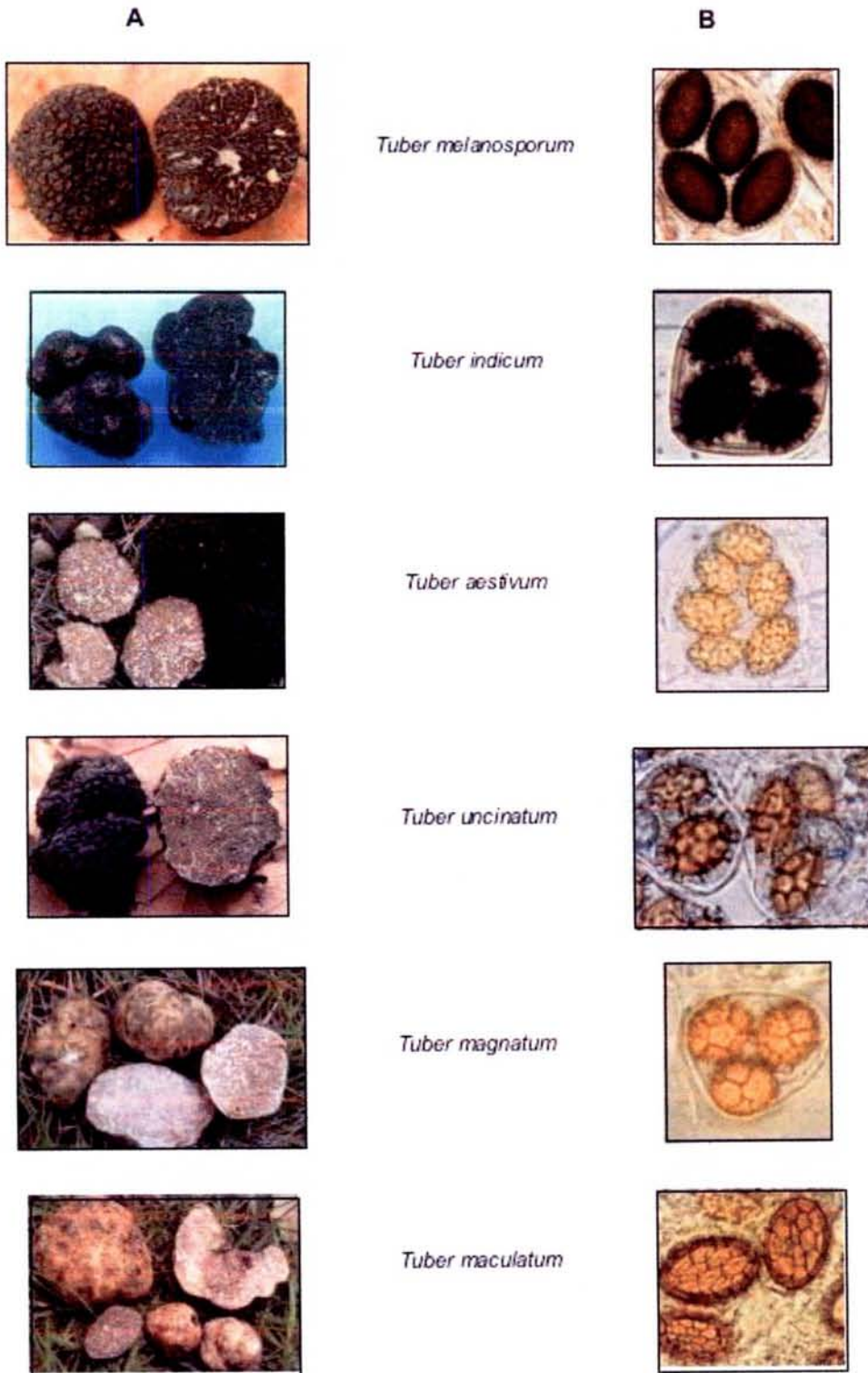
Même si Vittadini et les frères Tulasnes ont découvert la majorité des espèces de *Tuber*, d'autres ont été décrites plus récemment: *T. malençonii* (Donadini et al., 1978) ; *T. regianum* (Montecchi et Lazzari, 1987) ; *T. pseudoexcavatum* en Chine (Wang et al., 1998).

Comme nous venons de le voir, les truffes ont donné lieu à un certain nombre d'études et cela depuis plusieurs siècles. Ces travaux se sont basés, dans un premier temps, sur l'observation des corps fructifères au microscope et à la réalisation de clefs d'identifications établies sur les caractéristiques du péridium (aspect, couleur, dimensions) et sur celles des spores (forme, ornementation) (Figure 3). Toutefois, l'utilisation de ces clefs de détermination est difficile et reste le privilège de spécialistes. De plus, il existe de fortes similitudes morphologiques entre certaines espèces qui rendent l'identification difficile, c'est le cas pour *T. aestivum*-*T. uncinatum*, *T. brumale*-*T. moschatum*, *T. melanosporum*-*T. hiemalbum* (Chevalier et al., 1985).

Ces problèmes d'identification taxonomique sont d'autant plus importants si l'on souhaite caractériser les mycorhizes et non les ascocarpes. C'est pourquoi, depuis le début des années 1980, beaucoup d'études se sont consacrées à la réalisation de nouveaux outils d'identification des espèces de *Tuber*, nous y reviendrons au paragraphe 1.4.2.

Cette première partie de l'introduction nous a permis d'avoir une idée générale sur les truffes. Il s'agit de champignons ascomycètes ectomycorhiziens du genre *Tuber*. Les études les concernant ont été très nombreuses depuis le XVI^e siècle et elles ont posé les bases de la taxonomie, de l'écologie, de la biologie et de la génétique des *Tuber*. Dans les paragraphes qui suivent nous entrerons plus en détail sur les études plus récentes concernant ces différents points. Mais, j'ai trouvé nécessaire de parler tout d'abord de la relation Truffe/homme.

Figure 3. Ascocarpes (A) et spores (B) de quelques espèces de truffes.



1.2 Les truffes et l'homme : place de la trufficulture dans la société rurale

Au-delà de la mythologie, des pouvoirs magiques et aphrodisiaques, les truffes présentent bien d'autres intérêts. Le premier qui vient à l'esprit est l'intérêt gastronomique, mais il existe aussi beaucoup d'autres raisons de s'intéresser à ces champignons. C'est ce que nous allons voir dans ce premier paragraphe.

1.2.1 Quelles sont les intérêts des truffes et de la trufficulture?

1.2.1.1 Intérêt gastronomique et culturel

D'abord simple tubercule entrant dans la chaîne alimentaire des premiers hommes vivant sur les territoires où elle prospérait, les truffes n'étaient qu'un élément médiocre, parce que récoltées au moment de leur grossissement. La truffe s'offrait alors à leurs yeux et constituait une pitance facile d'accès. Peu à peu on apprendra à attendre sa maturité. Mais ce n'est que lorsque les civilisations méditerranéennes se développeront qu'elle prendra une place de plus en plus importante. Elle pourra dès lors apparaître sur la table des Grands. Elle était rarement cuisinée à son avantage ; accommodée le plus souvent avec force herbes et épices, il lui était impossible de s'exprimer. Après la décadence romaine (450 ap. J.C), elle semble avoir été oubliée pendant près de mille ans, tout au moins dans les hautes sphères. Invasions et famines se suivant, seuls les Seigneurs locaux perpétuèrent sa tradition. Après que les Papes venus en Avignon l'eurent remise à la mode, les cours royales leur emboîtèrent le pas. Son exotisme en faisait un produit de luxe et un signe de richesse. François 1^{er} et à sa suite tous les Bourbons cédèrent aux charmes de la truffe et en firent l'ordinaire de leurs fêtes grandioses.

Le parcours gastronomique de la truffe amorça un tournant, lorsque des Chefs célèbres du 18^e comme Carême ou Brillat-Savarin comprirent qu'il fallait la cuisiner pour elle-même et lui donnèrent ses vraies lettres de noblesse. La truffe est maintenant proposée dans les plus grands restaurants et elle fait partie des mets les plus recherchés comme le montre le menu proposé au Sénat le 23 février 2002 (Encadré 3).

Les truffes font partie du patrimoine gastronomique et culturel de plusieurs régions en Europe, comme le Périgord, le Quercy, le sud-est de la France ; le Piedmont, les Marches en Italie ; la province de Teruel en Espagne.

Dans ces régions, de nombreuses manifestations culturelles, comme des foires, ont lieu autour de la truffe. Mais bien d'autres régions et pays en produisent et donc en consomment (Hongrie, Croatie...). Pour donner un exemple de l'internationalisation des *Tuber*, 300 participants provenant de 18 pays différents se sont retrouvés au 3^e Congrès International consacré aux Truffes à Aix-en Provence, en 1999.

Encadré 3 Menu servi lors du dîner truffes à la présidence du Sénat le 13 février 2002 et préparé pour le président Christian Poncelet par l'équipe de cuisiniers dirigée par un lotois, M. Mathou :

Porcelaine Lutée au *Tuber melanosporum*
Bouillon de Bresse au Céleri

Petit Homard Breton poêlé au beurre demi-sel
Cannellonis aux truffes noires et Palourdes

Granité au Marasquin et Truffes confites
Gelée de Vieux Porto

Coulommiers Affiné au Diamant du Quercy
Salade Amère parfumée aux Cèpes

Moelleux tiède Grand Caraque
Crèmeux aux Truffes
Macération de Mas Amiel

Café Moka et Mignardises

1.2.1.2 Intérêt économique

Les *Tuber* ne sont pas les seuls champignons comestibles ayant un intérêt économique : *Boletus edulis* peut se vendre entre 13 et 19,8 €/Kg, *Cantharellus cibarius* de 8 à 19 € et *Tricholoma matsutake* de 40 à 500 € (Hall et al., 2003). Cependant, certaines espèces de truffes sont devenues des produits de luxe qui sont malheureusement inaccessibles à la majorité des consommateurs. En effet, les cours de *T. melanosporum* sur les marchés de gros français de 1990 à 2001 étaient de 182 à 480 €/Kg (Tableau 3). À la veille de Noël 2003, elle a atteint un prix record de 3 000 €/Kg dans une épicerie parisienne ; les producteurs de Périgueux, quant à eux, la vendait 1 500 €/Kg (Le Trufficulteur français n°45 p3). Pour la saison 2000-2001, le chiffre d'affaires global de *T. melanosporum* en France est estimé à 66,6 millions d'euros.

Si l'on pense qu'à la fin du XIX^e siècle, la production de T. melanosporum était de 1588 tonnes (Chatin, 1869), cela représenterait actuellement un marché de plus de 380 millions d'euros !

Tableau 3 Bilan des campagnes truffières françaises de 1990 à 2002
(Estimations faites pour *T. melanosporum*).

Saison	France		Espagne		Italie	
	Production globale*	Prix moyen** €/Kg	Production globale*	Prix moyen*** €/Kg	Production globale*	Prix moyen €/Kg
1990-1991	17	301	30		5	
1991-1992	20	360	10		5	
1992-1993	31	208	23		3	
1993-1994	22	362	9		2	
1994-1995	12	380	4	210	30	
1995-1996	19	258	20	127	25	
1996-1997	50	182	25	125	20	
1997-1998	30	214	80	115	24	
1998-1999	14	437	7	365	4	
1999-2000	40	465	35		10	
2000-2001	35	480	6		4	
2001-2002	15		20		5	572

* Estimations faites en tonnes.

** L'estimation des cours dans cinq gros marchés français : Valréas, Aups, Lalbenque, Carpentras et Richerenque. Les données présentées sont celles du Service des Nouvelles des Marchés du ministère de l'Agriculture.

***Données d'après Santiago Reyna dans le Trufficulteur français n°32 p11.

Toujours pour la truffe du Périgord, il a été estimé qu'elle représente de 1,4 à 6,4 % du revenu net d'exploitation moyen annuel (RNE) dans les principaux départements producteurs (Courvoisier, 1992).

Mais, *T. melanosporum* n'est pas la truffe la plus chère au monde, puisque la truffe blanche du Piémont, *T. magnatum*, bat tous les records. En octobre 2001, elle s'est vendue jusqu'à 8000 €/Kg (cf § 1.1.1). Au marché de Murisengo (Piémont, Italie) en Novembre 2000, une truffe de 375g a été commercialisée environ 7800 €/Kg, elle a donc rapporté à son heureux récolteur environ 2900 €! Ces chiffres illustrent bien le considérable intérêt économique de la production de truffes.

Comment peut-on expliquer la forte valeur économique de certaines espèces de truffes ?

La principale raison vient de leur intérêt gastronomique, il s'agit de produits très recherchés mais aussi très rares ! Comme nous l'avons dit, *T. melanosporum* a vu sa production diminuer de 1588 tonnes à la fin du XIX^e à moins de 100 tonnes actuellement. Donc l'offre ne peut satisfaire la demande et dans les années creuses, les prix flambent. Il en est de même

pour *T. magnatum* dont la distribution est limitée à l'Italie et à quelques autres pays comme la Croatie, la Slovénie et la Hongrie. La production italienne de cette truffe est d'environ 50 tonnes ce qui est très peu compte tenu de la demande. D'autre part, la culture de cette truffe n'est pas encore maîtrisée, nous y reviendrons au paragraphe 1.2.3.

1.2.1.3 Intérêt humain

En fait, les truffes maintiennent une présence humaine dans des régions défavorisées. Elles se développent souvent dans des zones peu propices aux cultures traditionnelles, il s'agit donc, pour l'agriculteur, d'un bon moyen de diversification. Compte tenu de leur prix, elles fournissent un bon revenu complémentaire et peuvent même constituer un substitut appréciable aux productions agricoles dans des régions peu compétitives. La trufficulture lutte donc contre la désertification.

1.2.1.4 Intérêt écologique

Les truffières nécessitent un entretien régulier, elles maintiennent donc un équilibre dans l'environnement. En fait, des études ont été réalisées sur les techniques sylvicoles permettant de maintenir la production de truffières naturelles de *T. melanosporum* (Reyna et al., 2002). Ces techniques culturales entretiennent donc les forêts et ainsi les préservent des incendies.

1.2.1.5 Intérêt de développement rural

Depuis quelque temps, un tourisme s'est développé autour de la truffe avec l'ouverture de restaurants, de musées et d'agritourismes. Ces activités peuvent être l'œuvre de producteurs voulant se diversifier ou bien de personnes extérieures à la trufficulture, mais qui l'ont utilisée comme facteur intéressant de développement local (Le Trufficulteur français n°36 p9).

Par exemple, l'écomusée de la truffe à Sorges existe déjà depuis 20 ans et accueille 10 000 visiteurs par an. Depuis quelques années, de nombreux agritourismes se sont ouverts en France, en Espagne et en Italie. Ils constituent une bonne solution pour développer et surtout diversifier certaines régions déjà très touristiques. Je citerai l'exemple d'un agritourisme de la Toscane (Italie), Barbiella Nuova, qui propose comme activité la recherche de truffes blanches (<http://www.barbiellanuova.it>). Toujours en Italie, une association : « Città del tartufo » œuvre pour le développement et la connaissance des truffes, en organisant, par

exemple, des concours culinaires à base de ces champignons.

1.2.2 L'écologie des truffes : des connaissances indispensables pour les cultiver

Comme nous venons de le voir, la production de truffes présente divers intérêts, c'est pourquoi, leur culture a fait l'objet de nombreux essais plus ou moins fructueux. Toutefois, avant de pouvoir cultiver une espèce, et entre autres les truffes, il faut avoir quelques données sur son écologie et essayer de répondre à diverses questions :

- (i) Sur quels sols les trouve-t-on ?
- (ii) Sous quels climats poussent-elles ?
- (iii) Quels sont leurs hôtes ?
- (iv) Avec quels micro-organismes interagissent-elles ?

En effet, beaucoup de facteurs biotiques (champignons, bactéries et autres microorganismes ; mésofaune comme les lombrics ; l'hôte végétal) et abiotiques (composition physicochimique des sols ; climat comme la pluviométrie et la température) peuvent influencer la vie des truffes et favoriser ou inhiber la production d'ascocarpes (Figure 4).

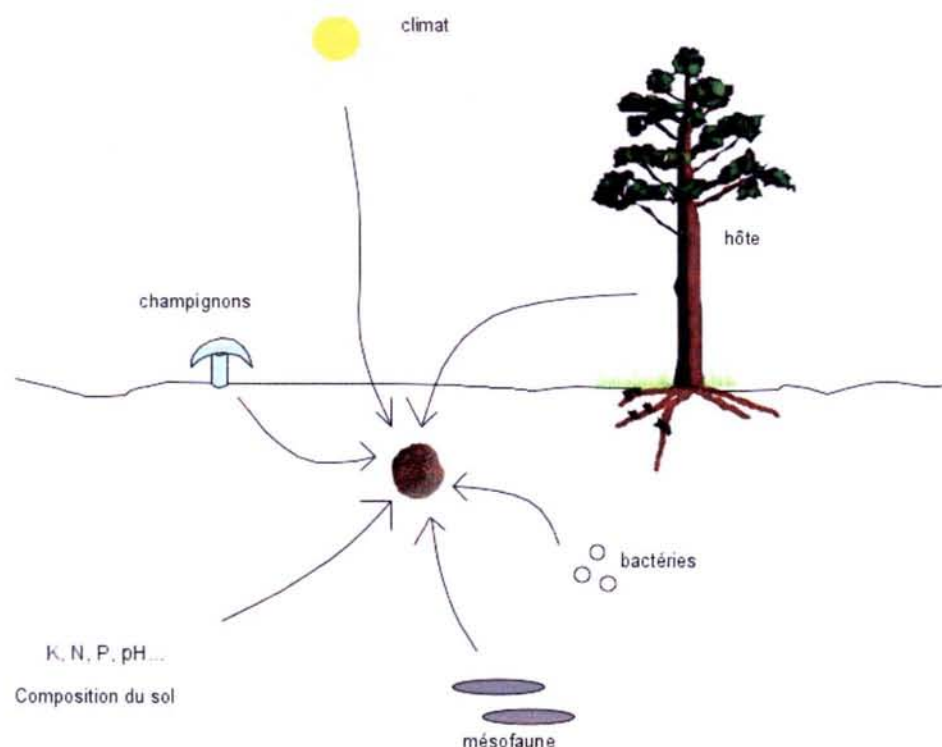


Figure 4. Facteurs abiotiques et biotiques pouvant influencer la vie des truffes.

Caractéristiques écologiques de quelques espèces de *Tuber*

Même s'il existe des différences écologiques entre les espèces de truffes, quelques caractéristiques générales sont communes : elles poussent dans des sols calcaires avec des pH compris entre 7 et 8 et présentent une large gamme d'hôtes (Tableau 4). En revanche, il existe de grandes différences concernant la distribution géographique des *Tuber*. *T. borchii*, *T. uncinatum* et *T. maculatum* sont les espèces ayant la plus grande répartition géographique puisqu'elles se retrouvent dans presque toute l'Europe, du Sud au Nord et même jusqu'à Moscou pour *T. maculatum* (Riousset et al., 2001). Par contre, *T. melanosporum* et *T. magnatum* ont une distribution géographique beaucoup plus restreinte (Tableau 4). Il existe même une espèce, *T. regianum*, qui est très rare et récoltée uniquement dans la province de Reggio Emilia en Italie (Montecchi et Lazzari, 1987 ; Riousset et al. 2001).

Tableau 4. Quelques caractéristiques écologiques de *Tuber uncinatum*, *T. magnatum* et *T. melanosporum* (d'après Chevalier et Frochot, 1997, Riousset et al., 2001 et Ceruti et al., 2003)

	<i>Tuber uncinatum</i>	<i>Tuber magnatum</i>	<i>Tuber melanosporum</i>
Distribution géographique	Vaste distribution dans toute l'Europe, du Portugal à la Suède et jusqu'en Russie à l'Est	Le principal pays de production de cette truffe est l'Italie, mais elle se trouve aussi quelquefois dans les pays de l'ex-Yougoslavie : Croatie et Slovénie ; ainsi qu'en Hongrie.	À l'état naturel, cette truffe est trouvée en France, en Italie et en Espagne. Maintenant on la trouve aussi aux USA, en Israël, en Nouvelle-Zélande et en Australie.
Caractéristiques du sol	Récoltée dans les terrains calcaires, drainés et caillouteux d'origine géologique variée avec des pH compris entre 7 et 8. On la retrouve dans les bois de feuillus et de conifères mais aussi avec des arbres isolés, à des altitudes variées jusqu'à 1400-1600 m.	Elle se trouve dans des sols marno-calcaires de l'ère tertiaire (surtout Miocène) et quelques fois de l'ère quaternaire (Pléistocène et Olocène), pauvre en P et en N à pH compris entre 7 et 8,5. Elle se récolte à des altitudes de 700 à 800 m, au fond des vallées, le long des fossés, en terrains aérés, un peu humides mais drainés.	Elle a pour habitat naturel les sols calcaires et calcaires argileux dérivés de la décomposition des roches de l'ère secondaire (Crétacé, Jurassique et Trias), mais aussi de l'ère tertiaire. Elle se récolterait aussi dans des sols de l'ère primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire ne dépassant pas 40% d'argile avec un pH entre 7,5 et 8,5. Elle se récolte entre 100 et 1100 m.
Hôtes	Elle s'associe à de nombreuses essences : chênes (sessiles, rouvres, pubescents, chevelus) et leurs hybrides, hêtres, noisetiers (communs et turcs), charmes (blancs et noirs), bouleaux, tilleuls, pins (sylvestres et noirs d'Autriche), épicéas, cèdres de l'Atlas.	Elle s'associe aux chênes (pédonculés, chevelus, pubescents), peupliers (blancs, noirs), trembles, charmes (blancs, noirs), saules blancs, saules des chèvres, tilleuls, noisetiers.	Elle s'associe aux chênes (pédonculés, sessiles, pubescents, verts, kermès, chevelus) et leurs hybrides, noisetiers (communs et turcs), charmes (blancs, noirs), tilleuls, bouleaux, châtaigniers, pins, cèdres, cistes.

Tableau 5. Caractéristiques physicochimiques des sols de truffières de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* (Chevalier et al., 2002).

	<i>T. melanosporum</i>	<i>T. uncinatum</i> (France)	<i>T. uncinatum</i> (Italy, Parma)
% fine earth			
clay	7.2 – 45.8	13.6 – 63.6	21 – 36
fine silt	3.5 – 53.3	11.3 – 49.7	
Rough silt	2.6 – 36.2	6.0 – 26.6	38 - 50
Fine sand	4.3 – 63.2	1.7 – 15.1	
Rough sand	0.5 – 70.0	0.6 – 54.0	14 – 41
pH	7.8 - 8.35	7.1 - 8.0	7.11 – 7.87
% fine earth			
Organic matter	8 – 83	44 - 211	23.1 – 70.6
C	4.7 – 50	28.99 – 155.65	
N	0.46 – 5.22	3.44 – 7.63	1.6 – 4.4
% fine earth			
Total CaCO ₃	Traces – 738	4 – 710	13 - 295
Active Ca CO ₃	10 – 181		10 – 109
Exchangeable Ca	4.75 – 13.5		
Exchangeable Mg	0.05 – 0.52	0.23 – 2.80	0.06 – 0.14
Exchangeable K	0.04 – 0.50	0.16 – 0.90	0.16 – 0.42
Exchangeable Na	0.008 – 0.038		
Extractable P ₂₀₅	0 .006 – 0.98	0.02 – 0.10	0.07 – 0.14

L'analyse physicochimique fine du sol de truffières de *T. melanosporum* et *T. uncinatum* en France et en Italie montre que cette dernière a une plus grande tolérance (Tableau 5). Les différences de distribution géographique observées chez les truffes sont dues principalement à leur exigence vis-à-vis du sol et du climat. En effet, *T. uncinatum*, qui est plus tolérante, a une plus grande distribution géographique que *T. melanosporum*, qui est plus exigeante.

Comme nous venons de le voir, les caractéristiques du sol des truffières sont relativement bien connues. Cependant, leur fonctionnement et l'interaction entre les truffes et les micro-organismes sont encore pour la plupart inconnus.

Interaction entre les Tuber et les champignons présents dans les truffières

Peu d'études se sont focalisées sur l'analyse de la biodiversité fongique et bactérienne au sein des truffières. Luppi (1973) a identifié des champignons qui semblent communs aux sols des truffières (*Mortierella alpina*, *Penicillium lilacium*, *P. thomii*, *Gliocladium roseum* et *Humicola fusco-atra* var *fusco-atra*). Plus récemment, De Miguel et al. (2002) ont étudié les mycorhizes et les fructifications trouvées dans six truffières espagnoles de *T. melanosporum*. Au niveau des mycorhizes, ils ont caractérisé 20 morphotypes, dont 17 identifiés, parmi lesquels six espèces de *Tuber*. Cependant, ils n'ont pas réalisé d'analyse moléculaire des mycorhizes, ce qui rend les résultats discutables car l'identification des mycorhizes est très difficile, nous y reviendrons ultérieurement (§1.4.2). Ces auteurs ont récolté des fructifications appartenant aux genres *Tuber*,

Genea, *Hymenogaster*, *Rhizopogon*, *Pisolithus* et *Scleroderma*. Dans un travail similaire, Rossi et al. (2002) ont analysé une truffière de *T. magnatum* en Italie. Ils ont trouvé des mycorhizes de type *Tuber*, mais ils n'ont pas formellement identifié des mycorhizes de *T. magnatum*.

Il existe donc peu d'informations sur les champignons qui coexistent avec les truffes.

Les bactéries et les truffes, une interaction semblant importante

Les bactéries peuvent aussi interagir avec les truffes. J. Chaze, professeur à la faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand, a mis en contact différentes cultures *in vitro* de truffes avec des bactéries provenant d'un sol truffier (Le trufficulteur français n°42 p12). Il en a conclu que le mycélium de *T. melanosporum* présente envers les bactéries des sols truffiers des propriétés abiotiques qui ne paraissent pas dépasser la bactério-stase, c'est-à-dire un arrêt provisoire de leur activité mais sans les tuer. De plus, il n'a pas mis en évidence d'effet antibiotique du mycélium de *T. melanosporum* sur les pathogènes de l'humain.

Mais quelles sont ces bactéries qui vivent en contact avec les truffes ?

Citterio et al. (1995) ont isolé des *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas* et *Staphylococcus* à partir d'ascocarpes de *T. magnatum*, *T. borchii* et *T. maculatum*. Certaines souches de Pseudomonales, isolées de l'ascocarpe de *T. borchii*, ont la capacité de restreindre la croissance de champignons phytopathogènes et elles possèdent des capacités cellulolytique, chitinolytique et protéolytique *in vitro*, relâchant ainsi des métabolites utilisables par le mycélium de *T. borchii* (Sbrana et al., 2000 ; Citterio et al., 2001). De même, des bactéries cultivables vivant strictement associées aux mycorhizes de *T. borchii* ont été isolées (Sbrana et al., 2002). L'espèce la plus représentée est *Pseudomonas fluorescens*, mais il existe aussi *P. corrugata* et au moins trois groupes d'Actinomycètes. Plusieurs de ces bactéries favorisent la croissance du mycélium de *T. borchii*. Enfin, Barbieri et al. (2000) ont identifié des bactéries non cultivables associées au mycélium de *T. borchii*. Elles appartiennent au sous-groupe des *Sphingobacterium* des *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* et il semble qu'elles peuvent être intra-ou extracellulaire (Barbieri et al., 2000 et 2002a). Leur nombre a été estimé à approximativement 10^6 cellules pour un mycélium de 30 jours (Barbieri et al., 2002b), toutefois leur rôle n'est pas encore connu.

Il existe donc des bactéries vivant étroitement liées aux truffes, elles semblent avoir un effet bénéfique en aidant leur nutrition et en éliminant les champignons compétiteurs, mais leur rôle exact est encore inconnu.

Il existe aussi des levures vivant au contact des truffes

Dans une analyse de trois truffières italiennes de *T. aestivum*, Zacchi et al. (2003) ont isolé plusieurs espèces de levures : *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicolus*, *Rhodotorula mucilaginosa* [*R. rubra*], *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces paradoxus*. Parmi celles-ci, les *Cryptococcus* semblent spécifiques de l'écosystème truffier, puisque *Cryptococcus albidus* est retrouvé dans la majorité des prélèvements. Elles pourraient avoir un rôle dans la nutrition de l'ascocarpe (cf. § 1.3.3.2).

Certaines caractéristiques écologiques des truffes sont connues comme : leur distribution géographique, les caractéristiques physico-chimiques des sols truffiers, leurs hôtes. Mais il reste de nombreuses inconnues concernant le fonctionnement des truffières et les interactions des truffes avec les autres micro-organismes : bactéries, champignons et levures. Il reste donc beaucoup de travail à faire pour comprendre le fonctionnement des truffières.

1.2.3 La trufficulture, un problème vieux de plusieurs siècles

1.2.3.1 Tuber melanosporum, la première truffe cultivée

Les premières expériences ont eu lieu en France

Au XVI^e siècle, Bruyerin, médecin de François I^{er}, rapporte que la culture de la truffe (*T. melanosporum*) est possible (Callot, 1999). Mais la trufficulture a pris son véritable essor au XVIII^e siècle grâce à la découverte de Talon qui planta des glands de Chêne et récolta des truffes à proximité des jeunes arbres plusieurs années après (Hall et al., 2003). Auparavant, elles n'étaient qu'un produit de cueillette, au même titre que les autres champignons.

À partir de cette époque, de nombreuses plantations de Chênes truffiers sont installées sous forme de boisements épars et de vergers cultivés. Mais c'est surtout à partir de 1880, après la crise phylloxérique, que de nombreux vignobles ont été transformés en truffières expérimentales (Dupré, 1997). Ainsi, la fin du XIX^e siècle est une période faste pour la trufficulture, avec une production de 1588 tonnes (Chatin, 1869). Depuis, elle a continuellement diminué, pour être inférieure à 100 tonnes de nos jours (Tableau 3). Les raisons de cette chute de production sont nombreuses et difficiles à analyser puisque les chiffres sont parfois critiquables. Toutefois, la première guerre mondiale et l'exode rural qui ont fait disparaître la main d'œuvre qualifiée, ainsi que le vieillissement des

truffières, peuvent en partie expliquer ce déclin (Dupré, 1997).

Depuis le début de la trufficulture, les techniques culturales ont profondément évolué. Nous sommes passés d'un modèle forestier, avec le semis de glands, à un modèle scientifique (Callot, 1999). En effet, les prototypes des premiers plants mycorhizés par la Truffe noire du Périgord, en France, ont été réalisés en 1970, à l'INRA de Clermont-Ferrand (Chevalier et Grente, 1979). Les premiers plants produits à grande échelle ont été commercialisés sous licence INRA dès 1972, par la société civile AGRI-TRUFFE (Dupré, 1997). Cette nouvelle technique permet un début de production plus rapide : 5 à 10 ans après plantation (Le Tacon et al., 1988). Cependant, il existe des problèmes dus à l'adaptation de ce matériel végétal à l'hétérogénéité des milieux et des pédo-climats, mais aussi à la pérennité du champignon. En effet, dans de nombreuses plantations, *T. melanosporum* est remplacé par *T. brumale*. Toutefois, les relations existant entre ces deux champignons sont complexes puisqu'il semblerait que *T. brumale* stimule le développement de *T. melanosporum* dans certaines conditions (Mamoun et Olivier, 1993).

Malgré les problèmes dus aux contaminations et à la survie de l'inoculum, actuellement, plus de 80% de la production française de T. melanosporum provient de truffières artificielles (Le Trufficulteur français n°45, p6).

La France n'est pas le seul pays où la trufficulture est importante, c'est aussi le cas en Italie

Comme la France, l'Italie a une longue tradition de la truffe. C'est pourquoi, de nombreux italiens ont contribué à la connaissance de ces champignons (cf. § 1.1.3). En fait, les problèmes rencontrés par la trufficulture italienne sont très proches de ceux des français. Par exemple, de nombreuses truffières de plants mycorhizés avec *T. melanosporum* sont contaminées par *T. brumale*. D'autre part, peut-être plus que dans les autres pays, la production de truffes est en baisse en Italie comme l'indique le Tableau 3.

T. melanosporum se retrouve dans de nombreuses régions italiennes: Ligurie, Vénétie, Emilie, Romagne, Toscane, Ombrie, Trentin Marches, Abruzzes, Latium, Campanie et Piémont. Il y a quelques années les plantations artificielles de cette truffe étaient moins nombreuses qu'en France, mais vu la baisse de production elles se sont multipliées. Toutefois, pour les italiens, le principal problème est la baisse de production de *T. magnatum*, et là les techniques culturales ne sont pas encore bien au point comme nous le verrons dans le paragraphe 1.2.3.2.

Pour conclure, en Italie, peut-être plus qu'en France, il semble que le rôle touristique et gastronomique prédomine par rapport à la productivité dans la trufficulture.

Et l'Espagne ? (d'après Reyna dans Le trufficulteur français n°32 p10-14)

Bien que les truffes soient connues en Espagne depuis les Romains, il faut attendre la moitié du XIX^e siècle pour que la récolte de *T. melanosporum* commence. Chatin (1892) rapporte l'exportation de 877 Kg de truffes de l'Espagne vers la France. Contrairement à la France et à l'Italie il n'existe pas d'usage traditionnel de la truffe en gastronomie, elle est utilisée par les restaurateurs depuis seulement une cinquantaine d'années.

Les régions productives espagnoles sont l'*Andalucia* (10 hectares), l'*Aragon* (900 hectares), la *Castilla-la Mancha* (80 hectares), la *Castilla-Leon* (750 hectares), la *Cataluna* (30 hectares), la *Comunidad Valenciana* (150 hectares), la *Navarra* (100 hectares) et *Pais Vasco* (70 hectares). À l'exception de la *Castilla-Leon* qui ne produisait que *T. aestivum* toutes ces régions produisent *T. melanosporum* de façon naturelle.

La plus ancienne plantation connue et documentée date de 1968 à Castellon, elle a été réalisée avec des semis de chênes truffiers sans aucune inoculation. Dans les années 1970-1980 a été créée à Arotz-Catesa la plus grande exploitation truffière au monde, elle fait 600 hectares. Actuellement, la trufficulture en Espagne est bien implantée et la production de *T. melanosporum* est importante comme lors de l'année 1997-1998 où elle a atteint 80 tonnes (Tableau 3).

Pour conclure, l'Espagne a un grand potentiel de production truffière car la superficie potentiellement utilisable en trufficulture est d'environ 10 millions d'hectares.

Introduction de T. melanosporum dans des pays non producteurs naturellement

La possibilité d'utiliser des plants inoculés par *T. melanosporum* a permis l'introduction de ce champignon dans des pays non producteurs naturellement, c'est le cas en Israël (Kagan-Zur et al., 2001), aux USA (Ceruti et al., 2003), en Nouvelle-Zélande (Hall, 2004) et en Australie (Malajczuk, communication personnelle).

Je citerais l'exemple de la Nouvelle-Zélande, qui est un pays de l'hémisphère sud. Très peu de champignons consommés en Europe

poussent naturellement dans l'Hémisphère Sud à l'exception du Cèpe de Bordeaux (*Boletus edulis*), du Lactaire délicieux (*Lactarius deliciosus*) et de la blanquette (*Tuber borchii*). Ces champignons ont vraisemblablement été amenés en Nouvelle-Zélande de manière fortuite par les premiers colons. À la fin des années 1970, Ian Hall, a convaincu les autorités locales du marché potentiel des champignons comestibles dans ce pays étant donné que les mois hivernaux (mai à août) sont en dehors de la période de production de l'Hémisphère Nord (Hall, 2004). Étant donné que la plupart des sols de la Nouvelle-Zélande sont acides, il a fallu apporter 50 tonnes à l'hectare de calcaire pour réaliser les truffières afin de changer la nature du terrain. Vers 1990, les premiers plants truffiers sortaient des laboratoires et 11 truffières furent mises en place. Les premières truffes noires (*T. melanosporum*) ont été récoltées en 1993. Actuellement 6 des 11 truffières produisent. Entre autres, une truffière de 600 m² a produit, en 2002, 12 kg de truffes (Hall, 2004).

1.2.3.2 Qu'en est-il pour les autres espèces ?

Parmi les autres espèces de truffes cultivées, *T. uncinatum* l'est depuis plusieurs décennies

La truffe de Bourgogne (*T. uncinatum*) est une des espèces ayant la distribution géographique la plus grande : on la retrouve du sud de l'Europe (Italie, Espagne, Portugal...) jusqu'au nord (Angleterre, Suède...), mais aussi à l'Est (République Tchèque, Pologne...) (Tableau 4). Elle a même été retrouvée dans des paquets de truffes provenant de la Chine (Chevalier et al., 2002). Même si elle est moins recherchée par les consommateurs que *T. melanosporum* ou *T. magnatum*, elle a aussi d'excellentes qualités organoleptiques qui ont conduit les chercheurs à développer sa culture depuis 30 ans (Chevalier et Frochot, 1989, 1990). En fait, les modèles de culture de *T. melanosporum* peuvent être utilisés pour *T. uncinatum* (Sourzat, 1994) mais du fait de sa plus grande distribution, *T. uncinatum* peut être planté dans des sols plus variés que *T. melanosporum*.

Dans la province de Parme (Italie), des plants inoculés par *T. uncinatum* ont été plantés en 1988 et les premiers brûlés sont apparus en 1992. Les premiers ascocarpes ont été récoltés en 1995 et en 1996 un kilo de truffe a été récolté sur 800 m² soit 12,5 Kg/Hectare (Belloli et al., 1999).

La blanquette (*T. borchii*), une autre truffe cultivée.

T. borchii se trouve dans presque toute l'Europe : du Nord (Angleterre, Danemark) au Sud (Italie), mais aussi à l'Est (Pologne, Hongrie). La

blanquette, tout comme *T. magnatum*, est une truffe blanche, mais elle est moins connue. Toutefois, en Italie, entre Ferrara et Ravenna elle a une bonne renommée et elle est au menu de plusieurs restaurants, il existe même un festival qui lui est consacré. Cette truffe a plusieurs avantages : bonne compétitivité, large gamme d'hôtes, elle augmente la croissance de l'hôte plus que les autres espèces de truffes et de champignons ectomycorhiziens (Zambonelli et al., 2002) et elle présente une haute adaptabilité écologique. Donc, non seulement elle peut être cultivée pour la production de truffes, mais aussi pour sa capacité d'améliorer la croissance de l'hôte dans les programmes de re-forestation (Garbaye, 1991).

T. borchii est en fait l'espèce modèle pour les *Tuber* ceci est dû à sa croissance en culture pure relativement aisée, ce qui a permis l'obtention de mycorhizes *in vitro*, nous y reviendrons plus en détail dans le paragraphe 1.3.

Comme nous l'avons dit, il s'agit d'une truffe très compétitive. Des essais en pépinière ont montré que le seul champignon capable de rivaliser avec elle était *Hebeloma sinapizans* (Zambonelli et Branzanti, 1990). Cependant il semble que dans la nature, *H. sinapizans* soit moins compétitif envers *T. borchii* (Zambonelli et al., 2002). Dans une truffière expérimentale italienne plantée en 1985, les premiers ascocarpes sont apparus après cinq ans et après seulement quatre ans dans une autre plantée en 1990 à Marina di Ravenna (Italie).

En revanche, la culture de *T. magnatum* n'est pas encore bien maîtrisée

T. magnatum étant la truffe qui présente la plus forte valeur économique, il est donc facile de comprendre pourquoi sa culture est une des priorités actuelles du monde de la trufficulture. Contrairement à *T. borchii*, il est beaucoup plus difficile de travailler avec *T. magnatum*, car les cultures pures de ce champignon sont encore impossibles. De plus, durant longtemps, les mycorhizes de *T. magnatum* ont été confondues avec celles de *T. borchii* et de *T. maculatum* (Mello et al., 2001; Rubini et al., 2001). Ceci a entraîné la plantation d'arbres mycorhizés avec la mauvaise espèce. C'est pourquoi, la plupart des truffières expérimentales produisent *T. borchii* ou *T. maculatum* et non *T. magnatum*. Ceci est d'autant plus vrai qu'il n'existe pas de législation italienne sur la vente des plants mycorhizés. Une autre explication de ces problèmes de contaminations par d'autres espèces, pourrait être une plus faible compétitivité de *T. magnatum* par rapport aux autres espèces de *Tuber* (Mello et al., 2001; Rubini et al., 2001).

Toutefois, quelques truffières « idéales » ont vu la production de *T. magnatum*, mais il s'agit de cas isolés. Je citerai l'exemple d'un trufficulteur qui a récolté en 2002, 7 Kg de *T. magnatum* dans une truffière artificielle près d'Asti (Le trufficulteur français n°46, p16). Malgré ces quelques succès, il est nécessaire de mieux connaître l'écologie de cette truffe et d'améliorer les techniques culturales. Par exemple, à ma connaissance, seulement une publication a rapporté l'identification de mycorhizes de *T. magnatum* dans une truffière naturelle (Urbanelli et al., 1998b).

Dans ce paragraphe, nous avons vu comment les truffes et la trufficulture sont étroitement liées à l'homme et à la société humaine, principalement en France, en Italie et en Espagne. Parmi les principaux intérêts de la production de truffes, nous avons identifié des intérêts gastronomique et culturel, économique, humain, écologique et de développement rural. L'écologie de ces champignons est de mieux en mieux connue, ce qui a conduit, avec plus ou moins de succès, à la culture de certaines truffes (*T. melanosporum*, *T. uncinatum* et *T. borchii*). Mais pour le moment la culture de *T. magnatum* est encore mal maîtrisée. Malgré ces succès, la réalisation de truffières expérimentales est encore aléatoire car il existe de nombreux problèmes : compétition entre la truffe et les autres champignons ectomycorhiziens, qualités des plants inoculés, bonnes techniques culturales pour les truffières, fraude...

Il reste à mieux connaître l'interaction entre les truffes et les micro-organismes présents dans le sol des truffières (bactéries, champignons et levures) afin d'augmenter le rendement des plantations, mais aussi de cultiver avec succès les espèces pour lesquelles nous rencontrons des problèmes.

Dans la troisième partie de l'introduction, nous allons voir plus en détail la biologie des truffes, nous ferons une mise au point des connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires qui régulent les différentes phases du cycle biologique des *Tuber*.

1.3. Biologie des truffes

Le cycle biologique des *Tuber* n'est pas bien connu. Cependant, en se basant sur les données disponibles chez les autres Ascomycètes comme *Pyronema confluens* (Glass et Staben, 1990), *Neurospora crassa* (Glass et Kuldau, 1992) et *Podospora ssp* (Robert, 1995) ; Lanfranco et al. (1995) ont proposé un cycle vital probable pour les truffes (Figure 5). Ce cycle comporte trois phases : une phase saprotrophique, une phase symbiotique et une phase reproductive. Toutefois, il reste de nombreuses questions sur la biologie des truffes :

- (i) *Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?*
- (ii) *Lors de la phase saprotrophique, quelle est la distribution du mycélium dans le sol des truffières ?*
- (iii) *Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de chaque phase ?*
- (iv) *Quels sont les facteurs qui déclenchent les changements de phases ?*

Dans ce paragraphe, nous allons essayer de répondre à ces interrogations. Je donnerai une vue d'ensemble, mais sûrement non exhaustive, des études morphologiques, biochimiques et moléculaires, réalisées chez les *Tuber* concernant les différentes phases du cycle biologique. Nous commencerons par la phase saprotrophique, puis nous verrons successivement la phase symbiotique et la phase reproductive.

1.3.1 La phase saprotrophique

Cette phase commence par la germination des spores dans le sol. Ensuite, les hyphes se développent jusqu'au contact des racines pour, ainsi, entrer en phase symbiotique. Pour le moment nous ne savons pas comment se nourrit le mycélium dans le sol, en revanche nous savons qu'il a des capacités saprotrophiques *in vitro*.

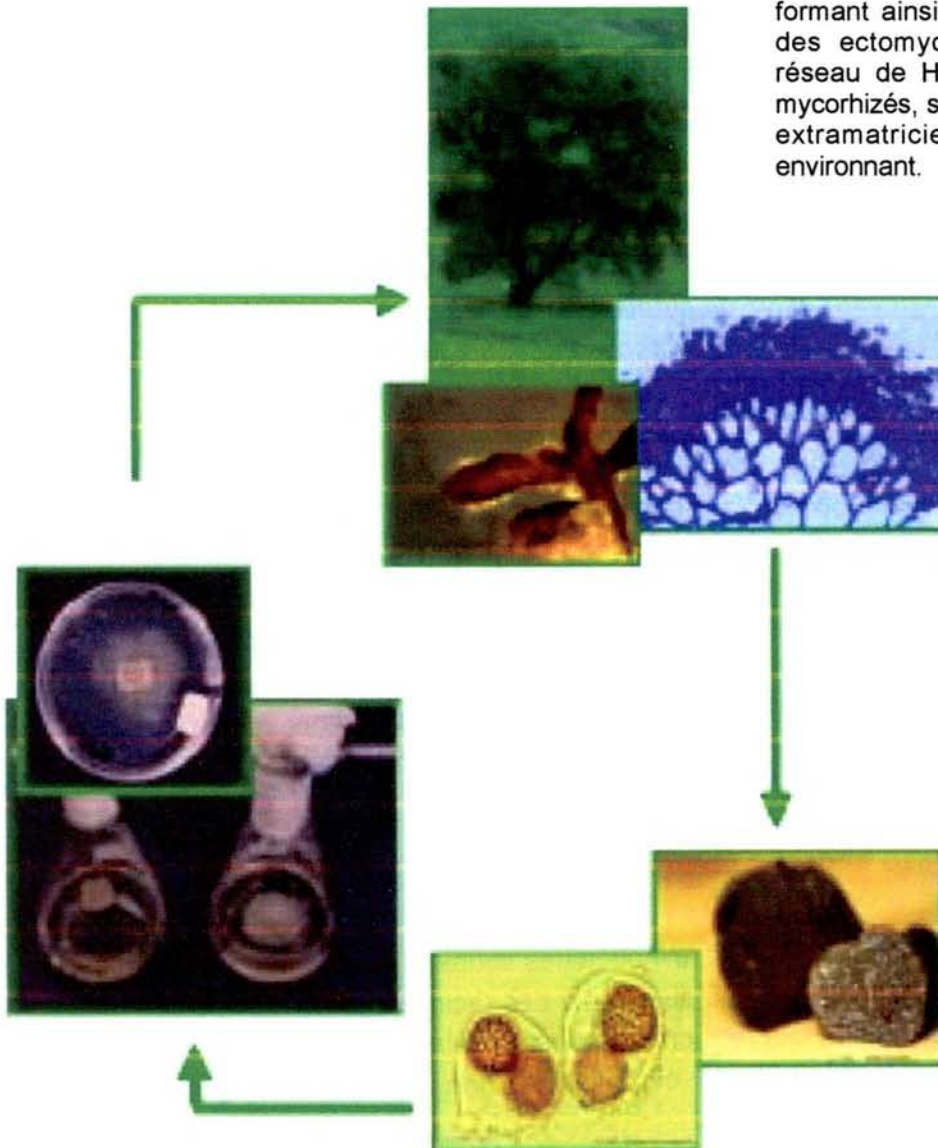
Mais que se passe-t-il lors de la phase saprotrophique?

1.3.1.1 Le mycélium colonise-t-il un vaste espace ou est-il confiné aux alentours des racines ?

En fait, la propagation du mycélium peut être limitée par différents facteurs comme : (i) la compétition entre espèces (Wu et al., 1999), (ii) les phénomènes d'incompatibilité somatique entre individus de la même espèce (Prospero et al., 2003), (iii) les changements de conditions physico-chimiques du milieu environnant (Buscot et al., 2000), (iv) mais aussi et

surtout, en tant qu'hétérotrophe, par la présence ou l'absence de substrats (Dickie et al., 2002 ; Landeweert et al., 2003).

Lors de la *phase symbiotique*, le mycélium prend contact avec les racines de la plante et les colonise, formant ainsi les structures typiques des ectomycorhizes : manteau et réseau de Hartig. Autour des apex mycorhizés, se développe le mycélium extramatriciel qui explore le sol environnant.



La *phase saprotrophique* est caractérisée par la germination des spores dans le sol et le développement du mycélium. Celui-ci pourrait former soit le primordium fructifère, soit les mycorhizes.

La *phase reproductive* commence par l'agrégation de deux hyphes pour donner l'ascocarpe. Mais ces deux mycéliums sont-ils identiques (autogamie) ou bien différents ? Pour le moment, nous ne savons pas si les truffes sont hétérothalliques ou homothalliques. Durant cette phase se produit la caryogamie et la formation des ascospores.

Figure 5. Cycle biologique des *Tuber* (d'après Lanfranco et al., 1995 ; Miozzi, 2003).

Pour connaître la distribution du mycélium dans le sol, il existe diverses techniques. La plus simple consiste à prélever directement le mycélium. Mais ceci n'est possible que pour les espèces formant des rhizomorphes ou des cordons, ce qui n'est pas le cas des truffes. L'isolement de mycélium en utilisant des milieux de cultures artificiels est une autre possibilité (Thorn et al., 1996 ; Prospero et al., 2003). Malheureusement, les truffes sont difficiles à cultiver *in vitro* et il est même impossible de cultiver certaines espèces comme *T. magnatum* (cf. § 1.3.1.2). Donc, la seule solution est de réaliser des extractions d'ADN directement à partir du sol. Cette technique a permis l'identification et la quantification du mycélium d'un champignon ectomycorhizien : *Hebeloma cylindrosporum* (Guidot et al., 2002 et 2004 ; cf. §1.4.1.2). A ma connaissance, de telles analyses n'ont pas encore été réalisées chez les truffes.

Donc, pour le moment, la répartition du mycélium des truffes dans les truffières est encore inconnue.

1.3.1.2 Réalisation de la phase saprotrophique *in vitro*

Les *Tuber* ne sont pas des symbiontes obligatoires, car il est possible de les isoler et de les faire pousser en boîtes de Petri *in vitro*. Actuellement, le mycélium *in vitro* de plusieurs espèces est disponible: *T. borchii*, *T. maculatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* et *T. brumale* (Saltarelli et al., 1998 ; Iotti et al., 2002). En revanche, la culture d'autres espèces, comme *T. magnatum*, reste encore impossible.

Quelle est la dynamique de croissance du mycélium de *Tuber* ?

Pour *T. borchii*, le profil de croissance est composé d'une phase de latence (*lag phase*), d'environ 15 jours, suivie d'une phase exponentielle de croissance jusqu'à environ 60 jours. Ensuite, elle rejoint un plateau (Figure 6; Saltarelli et al., 1998 et 1999 ; Iotti et al., 2002). En fait, toutes les espèces de truffes présentent le même type de croissance, avec une phase de latence allant de 3 jours (*T. rufum*) à 10 jours (*T. melanosporum*) (Figure 6; Iotti et al., 2002).

Durant la phase exponentielle de croissance, *T. rufum* est l'espèce qui croît la plus vite (14 mm/semaines) alors que *T. maculatum* (7 mm/semaines), *T. macrosporum* (4 mm/semaines), *T. borchii* (4 mm/semaines), *T. aestivum* (4 mm/semaines), *T. brumale* (1,9 mm/semaines), et *T. melanosporum* (1,1 mm/semaines) sont plus lentes (Iotti et al., 2002). Donc, pour la majorité des espèces, la croissance des mycéliums *in vitro* est lente. En fait, Saltarelli et al. (1999) ont montré que la vitesse de croissance dépend de la souche isolée. En effet, l'analyse de 4 souches différentes de *T. borchii* montre que toutes présentent une

phase de latence de 15 jours, mais après cette phase, la souche 1BO a une croissance exponentielle alors que les trois autres souches ont une croissance linéaire.

Ceci indique que des facteurs génétiques influencent la croissance des *Tuber in vitro*.

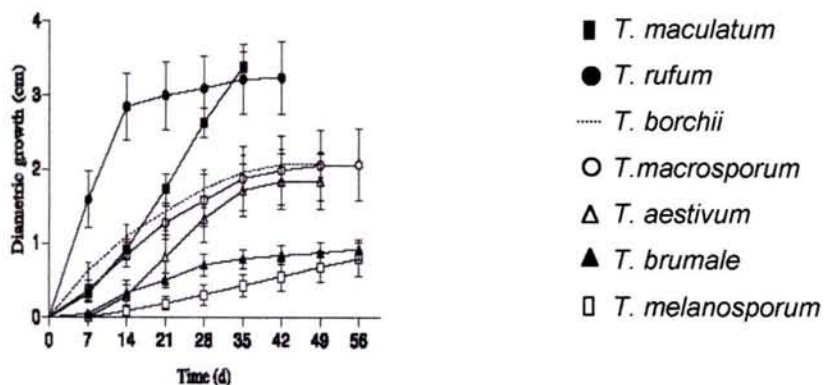


Figure 6. Courbes de croissances de quelques espèces de *Tuber* (d'après Iotti et al., 2002)

1.3.1.3 Quelles sont les voies métaboliques et les gènes exprimés lors de la phase saprotrophique ?

La réalisation de cultures mycéliennes *in vitro* a été le point de départ de nombreuses études ayant pour but de décrypter les voies métaboliques mises en œuvre par le mycélium lors de sa croissance, ainsi que l'expression génique en réponse à divers facteurs.

Quelle est l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium ?

Zeppa et al. (2001) ont analysé l'activité métabolique et transcriptionnelle du mycélium de *T. borchii* pour évaluer les différences physiologiques intervenant lors de la phase saprotrophique. La mesure de la quantité totale d'ARN, par poids sec de mycélium, indique un maximum d'activité aux alentours de 30 jours ($2,24 \pm 0,32 \mu\text{g mg}^{-1}$), ce qui est confirmé par le contenu en ergostérol, qui est un bon indicateur de l'activité métabolique. Après 70 jours, le taux d'ARN ($0,90 \pm 0,2 \mu\text{g mg}^{-1}$) et d'ergostérol diminue fortement. Ces mêmes auteurs montrent que si le taux d'ARN change, la composition en ARN ne semble pas changer. Il n'y aurait donc pas de modifications transcriptionnelles lors de la croissance de *T. borchii in vitro*.

De même, l'analyse d'un gène probablement impliqué dans la division des mitochondries (*Tbfs1*), indique que son expression est plus importante

dans du mycélium de 30 jours que dans du mycélium âgé (Guidi et al., 2003). Ceci est corrélé avec un plus grand nombre de mitochondries suggérant une plus grande activité.

Le thalle de T. borchii atteint donc un pic d'activité aux alentours de 30 jours, ensuite son métabolisme diminue.

Un autre facteur qui influence la croissance des hyphes lors de la phase saprotrophique est la lumière.

En effet, le mycélium de *T. borchii* a une croissance apicale limitée lorsqu'il est exposé à la lumière bleue (Ambra et al., 2004). Une réponse similaire, dépendante d'un récepteur (WC-1), est connue chez *Neurospora crassa* (He et al., 2002). Un homologue à WC1, comprenant un domaine photorecepteur (LOV), a été cloné chez *T. borchii* (*Tbbwc-1*). L'ARNm de ce gène augmente lors d'une exposition à la lumière (Ambra et al., 2004).

Mais comment expliquer la présence d'un photorécepteur chez un organisme hypogé ?

Ambra et al. (2004) suggèrent que ce photorécepteur pourrait prévenir la croissance du mycélium vers l'extérieur et donc l'obliger à rester dans le sol, pour ainsi faciliter sa rencontre avec les racines. Ceci explique que les cultures de *Tuber in vitro* se fassent à l'obscurité (Iotti et al., 2002).

Quelles sont les sources de carbone que peut utiliser le mycélium de truffe pour croître ?

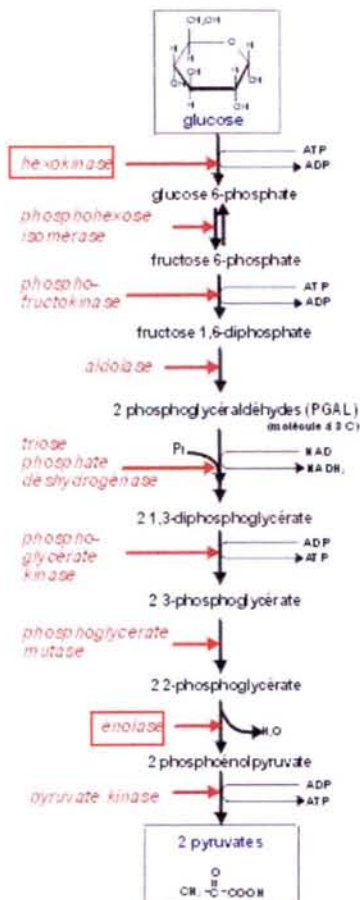
Le mycélium de *T. borchii* peut utiliser le glucose et le fructose (Saltarelli et al., 1998), contrairement à plusieurs autres champignons qui préfèrent le glucose au fructose (Lewis, 1986). Mais *T. borchii* utilise aussi le mannitol et le mannose, ce dernier étant la source carbonée avec laquelle le mycélium a une plus forte croissance (Ceccaroli et al., 2001). *T. melanosporum* peut, quant à lui, utiliser le mannose et le saccharose (Mamoun et Olivier, 1991), ce dernier n'étant pas utilisé par *T. borchii* (Saltarelli et al., 1998). En ce qui concerne les autres espèces : *T. maculatum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum*, *T. rufum* et *T. brumale* ; elles ont été isolées sur des milieux de culture riches en saccharose (Iotti et al., 2002).

Quelles sont les voies métaboliques du carbone actives chez le mycélium de truffes lors de la phase saprotrophique ?

Plusieurs études se sont focalisées sur le métabolisme du carbone chez *T. borchii*. Saltarelli et al. (1998) ont quantifié diverses enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates. Ces auteurs montrent que le mycélium atteint un pic d'activité aux alentours de 30 jours, comme nous l'avons déjà dit précédemment. Après 70 jours, les enzymes de la glycolyse diminuent, ce qui n'est pas le cas de celles de la voie des pentoses phosphates.

Plusieurs enzymes du métabolisme primaire carboné sont actuellement isolées et caractérisées. Ceccaroli et al. (1999) ont identifié trois formes distinctes d'hexokinase (HK_{M1}, HK_{M2} et HK_{M3}), qui est la première enzyme de la glycolyse (Figure 8). HK_{M1} et HK_{M2} sont présentes pendant la phase de croissance du mycélium, entre 15 et 50 jours, alors qu'HK_{M3} n'est exprimée que dans le mycélium plus âgé. Plus récemment, Agostini et al. (2001) ont isolé et caractérisé le gène *hvk-1* codant pour un polypeptide de 497 acides aminés et correspondant à l'isoforme HK_{M1}. En fait, l'expression des hexokinases est très régulée et elles contrôlent l'expression génique, en réponse aux modifications de la concentration en sucres, chez beaucoup d'organismes et, entre autres, chez les truffes (Agostini et al., 2001).

Un autre gène, *eno-1*, codant pour une énoïase (Figure 7), a aussi été caractérisé (Polidori et al., 2004). L'activité maximale de cette enzyme est observée pour des mycéliums âgés de 18 jusqu'à 30-40 jours, ce qui correspond aux résultats trouvés pour les hexokinases.



Chez le mycélium de *T. borchii in vitro*, la glycolyse et la voie des pentoses phosphates sont donc actives. Alors que cette dernière est toujours active dans le mycélium âgé, la glycolyse l'est surtout lors de la phase exponentielle de croissance.

Figure 7. Schéma de la glycolyse. En rouge sont indiquées les enzymes intervenant dans cette voie métabolique et celles qui ont été isolées chez *Tuber* sont encadrées.

Afin de caractériser l'assimilation du glucose et la biosynthèse des acides aminés, Ceccaroli et al. (2003) ont utilisé la résonance magnétique nucléaire et du [¹³C]-glucose. Ces auteurs montrent que l'assimilation de [¹³C]-glucose par du mycélium *in vitro* conduit à la production de mannitol. Ce dernier jouerait un rôle de réserve, mais serait aussi utilisé comme source de carbone alimentant le cycle de Krebs et la biosynthèse d'acides aminés.

Qu'en est-t-il pour l'assimilation de l'azote?

Le métabolisme azoté est aussi très important pour la biochimie des micro-organismes, puisqu'il est indispensable, entre autres, à la biosynthèse d'acides aminés, de purines, de pyrimidines et de protéines (Figure 8 ; Javelle et al., 2003). Pour les champignons ectomycorhiziens, des transporteurs de l'ammonium ont été identifiés chez *Hebeloma cylindrosporum* (Javelle et al., 2001 et 2003) et chez *T. borchii* (*TbAMT1*) (Figure 8 ; Montanini et al., 2002). Ce dernier code pour un polypeptide de 52 KDa et permet la complémentation d'une souche de levure déficiente pour l'assimilation de l'ammonium, prouvant ainsi sa fonctionnalité.

Les produits primaires de l'assimilation de l'azote par les champignons ectomycorhiziens sont le glutamate (Glu) et la glutamine (Gln) (Botton et Chalot, 1999). Ces acides aminés sont synthétisés par plusieurs enzymes : glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT) et glutamate déshydrogénase (GDH) (Figure 9). Chez le mycélium de *T. borchii*, des activités GS et NADPH-GDH ont été détectées (Pierleoni et al., 2001). Afin de mieux comprendre le métabolisme azoté, Vallorani et al. (2002) ont caractérisé un gène, *gdh*, codant pour une NADP-GDH. Ce gène a une régulation transcriptionnelle, puisqu'il est moins exprimé (10 à 12 fois) lorsque la source d'azote est l'ammonium plutôt que le glutamate, l'urée, le nitrate ou l'alanine. Guescini et al. (2003) ont, quant à eux, caractérisé un gène codant pour une nitrate réductase (*tbnr1*). Ces auteurs montrent que le mycélium, mis en culture avec du nitrate comme seule source d'azote, a un niveau d'expression de *tbnr1* 10 à 12 fois supérieur à du mycélium en culture avec du phosphate d'ammonium, du nitrate d'ammonium, de l'urée ou de la glutamine.

Ces études indiquent que le type de source d'azote est important car il régule l'expression des gènes du métabolisme azoté.

De même, une carence azotée, de deux à trois semaines, induit aussi une régulation des gènes du métabolisme de l'azote, mais, dans ce cas, il existe trois types de réponses (Montanini et al., 2002, 2003 ; Montanini, 2003):

- 1- Les gènes *Tbam1*, *Tbnt* et *Tbgs* sont induits par la carence azotée.
- 2- Les niveaux d'ARNm de *Tbgdh* et *Tbaat* diminuent.

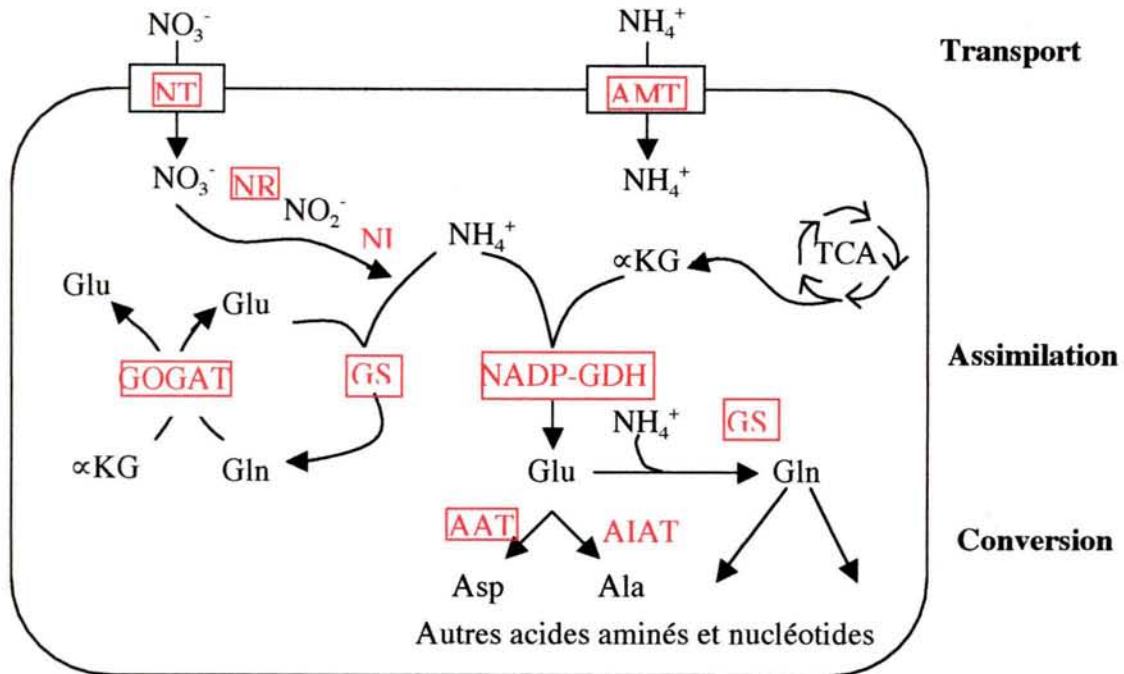


Figure 8. Voies d'assimilation de l'azote inorganique chez les champignons (d'après Montanini, 2003).

Sur le schéma sont indiqués les transporteurs (AMT : transporteur de l'ammonium ; NT : transporteur du nitrate), les enzymes du catabolisme du nitrate (NR : nitrate réductase ; NI : nitrite réductase), les enzymes d'incorporation de l'ammonium (GOGAT : glutamate synthase ; GS : glutamine synthétase ; GDH : glutamate déshydrogénase) et de conversion en autres acides aminés (AAT : aspartate aminotransférase ; AIAT : alanine aminotransférase). NH_4^+ : ammonium ; NO_3^- : nitrate ; TCA : cycle de l'acide tricarboxylique ; Gln : glutamine ; Asp : aspartate ; Ala : alanine ; αKG : α -cétoglutarate. Les enzymes caractérisées chez *Tuber* sont encadrées.

3- L'expression de *Tbgogat* ne change pas.

Il est intéressant de noter que la GS, enzyme fortement régulée par la carence azotée, est aussi très exprimée dans l'ascocarpe (cf. §1.3.3.4 ; Lacourt et al., 2002).

L'étude du transcriptome à l'aide de réseaux d'ADNc, comportant plus de 1200 gènes de *T. borchii* (Lacourt et al., 2002), à partir de sondes provenant de mycélium soumis à une carence azotée de courte durée (2 à 120 heures), montre que seul *Tbnt* est significativement modifié dans ces conditions (Montanini, 2003). En fait, les réponses à ce type de carence concernent principalement des protéines de surface et sécrétées, conduisant à la modification de la paroi cellulaire. Parmi ces protéines se trouve *Tbsp1*, nous en reparlerons un peu plus tard (Soragni et al., 2001 ; Lacourt et al., 2002 ; Montanini, 2003).

Donc, la disponibilité en azote régule aussi l'expression de plusieurs gènes du métabolisme azoté.

Quels sont les autres gènes importants exprimés lors de la phase saprotrophique?

Balestrini et al. (2000) ont montré que les chitines synthases (*Chs*) de classe II, III et IV sont exprimées dans le mycélium de *T. borchii*. Cette expression est indépendante de l'âge des hyphes. Étant donné que ces enzymes sont à l'origine de la formation de la chitine, elles devraient avoir un rôle dans la structure de la paroi cellulaire. Comme nous le verrons dans le paragraphe 1.3.3, les gènes de la *Chs* de *T. borchii* et de *T. magnatum* sont aussi exprimés dans l'ascocarpe (Balestrini et al., 2000 ; Garnerio et al., 2000).

Pour avoir des informations sur le protéome de *T. borchii*, Vallorani et al. (2000) ont réalisé une analyse en électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) des protéines sur du mycélium de 30 jours. Sur les 23 spots analysés, un seul, correspondant à une ubiquitine, a été identifié. En fait, Zeppa et al. (2001) ont cloné un gène (*Ubi1*) correspondant à une polyubiquitine. Ce gène est exprimé chez le mycélium de *T. borchii*, alors qu'il l'est moins dans l'ascocarpe et l'ectomycorhize. Ces auteurs suggèrent que l'ARN d'*Ubi1* s'accumule préférentiellement dans les cellules qui se répliquent. En fait, les ubiquitines sont importantes car elles jouent un rôle dans la dégradation des protéines, la réponse au choc thermique, le cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée et la différenciation (Bond et Schlesinger, 1985).

Enfin, une étude portant sur l'analyse d'une banque d'ADNc, chez le mycélium de *T. borchii*, mais aussi chez l'ascocarpe, montre que 22% des gènes exprimés dans le mycélium codent pour des enzymes du métabolisme primaire et secondaire (par exemple : phosphofructochinase, aldolase, citrate synthase, GS, Isocitrate lyase) (Lacourt et al., 2002). Les transcrits impliqués dans la réponse aux stress (10%), dans la signalisation cellulaire (7%) et dans la structure cellulaire représentent une plus petite partie des ADNc séquencés. Ces auteurs ont trouvé 16 gènes semblant spécifiques de la phase saprotrophique, malheureusement ils correspondent principalement à des protéines inconnues, leur fonction n'a donc pas encore été identifiée.

En conclusion de cette partie sur la phase saprotrophique du cycle biologique des *Tuber*, nous pouvons dire que cette phase est encore presque totalement inconnue *in situ*, par contre, elle est de plus en plus étudiée *in vitro*. Les voies métaboliques du carbone et de l'azote sont en partie décryptées et plusieurs gènes, codant pour des enzymes de ces voies métaboliques, sont caractérisés. Toutefois, ces données ne sont accessibles que pour *T. borchii*, et nous pouvons nous demander si les mêmes mécanismes se retrouvent chez les autres espèces de *Tuber*.

1.3.2 La phase symbiotique

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, les hyphes se développent dans le sol jusqu'au contact des racines pour ainsi entrer en phase symbiotique. En fait, les symbioses entre les champignons et les plantes s'appellent des mycorhizes (Tableau 6 ; Figure 9).

1.3.2.1 Généralités sur les mycorhizes

Que sont les mycorhizes ?

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, ils ont donc dû, au cours de l'évolution, développer différentes stratégies pour se procurer du carbone. Ils peuvent être saprotrophytes, endophytes, parasites ou symbiotiques. Parmi les symbioses mutualistes, un grand nombre ont lieu entre les champignons et les plantes, formant des organes appelés mycorhizes (Gr. *Mykes*=champignon ; *Rhyza*=racine). Les mycorhizes ont été décrites pour la première fois en 1885 par Frank, qui avait observé au niveau des racines des arbres une structure anatomique et morphologique dans laquelle étaient impliqués des *mycelia* fongiques. Ce n'est qu'en 1950 que les observations de Frank ont été confirmées par Melin et Nilsson. Les mycorhizes constituent une association symbiotique bénéfique aux deux partenaires. Le végétal profite des capacités exploratrices du champignon qui, quant à lui, profite de la phototrophie de la plante. Au total, 95 % des végétaux forment des symbioses mycorhiziennes (Malloch et al., 1980).

Il existe plusieurs types de mycorhizes. Les plus anciennes, les endomycorhizes arbusculaires (Figure 9 et Tableau 6), sont apparues avec les premières plantes terrestres il y a environ 300 millions d'années (Le Tacon & Selosse, 1994). Elles sont parfaitement adaptées aux climats chauds et aux écosystèmes terrestres à minéralisation rapide existant jusqu'à la fin de l'ère Secondaire. Ce type d'association, qui concerne 200 à 500 espèces, reste le plus répandu. Les changements de climats, dont une baisse de température, ont provoqué la formation, dès le Tertiaire, d'un deuxième type de mycorhizes, l'ectomycorhize (Figure 9 et Tableau 6 ; LePage et al., 1997), impliquant plus de 5000 espèces fongiques Basidiomycètes ou Ascomycètes (Molina et al., 1992). Cette association est dominante dans les écosystèmes forestiers tempérés sous latitude et longitude intermédiaires. Les autres types de mycorhizes décrits sont les endomycorhizes à pelotons éricoïdes et orchidées, et les ectendomycorhizes (Figure 9 et Tableau 6). Ces types ne concernent que peu d'espèces de champignons et ils sont encore mal connus.

Tableau 6. Caractéristiques sommaires des principaux types de mycorhizes (d'après Selosse, 1998).

Type morphologique	Endomycorhize "-arbusculaire"	Ectomycorhizes	Ectendomycorhizes	Endomycorhizes "à pelotons"	
				Ericacées	Orchidées
Photobionte	Plus de 80 % des spermatophytes et la plupart des Ptéridophytes	Spermatophytes ligneuses et de très rares Ptéridophytes	Spermatophytes (certains ligneux, certaines Ericales)	Spermatophytes et certaines Ptéridophytes	
Mycobionte	Non Septés		Septés		
	Glomales (Zygomycètes) 200 à 500 espèces	Ascomycètes et Basidiomycètes, 5000 espèces au moins	Quelques espèces d'Ascomycètes et Basidiomycètes	Ascomycètes	Moins de 100 espèces de basidiomycètes
Structure fongique	Vésicules seulement ou vésicules et arbuscules (suçoirs ramifiés intracellulaire)	Manteau fongique autour de la racine et réseau de Hartig cortical, strictement extracellulaire	Manteau plus ou moins épais, réseau de Hartig et suçoir (Monotropoïdes) ou peloton (Arbutoïdes) intracellulaires (variable)	Hyphes et pelotons intracellulaire	
Spécificité d'hôte	aucune	Nulle à forte selon le couple	?		
Ancienneté	Ordovicien		Crétacé (ou plus tardif?)		
Ressources exploitées par le mycobionte	Phosphore inorganique: soluble ou adsorbé; oligoéléments	Phosphore et azote organiques ou minéraux: solubles, adsorbés ou insolubles; oligoéléments	Mal connues et variables selon le type; le mycobionte peut être parasite ou mutualiste d'en autre végétal (<i>Monotropa</i>)	Phosphore et azote organique, parfois glucides insolubles (cellulose,...)	
Localisation majeure	Tous les sols, sauf sols hydromorphes: sols tropicaux et tempérés; peu fréquent en sol boréal	Divers sols, dont ceux moyennement minéralisés: sols tempérés et boréaux, parfois tropicaux		Sols à matière organique non minéralisée: sols boréaux et d'altitude surtout, les orchidées sont plus ubiquistes	

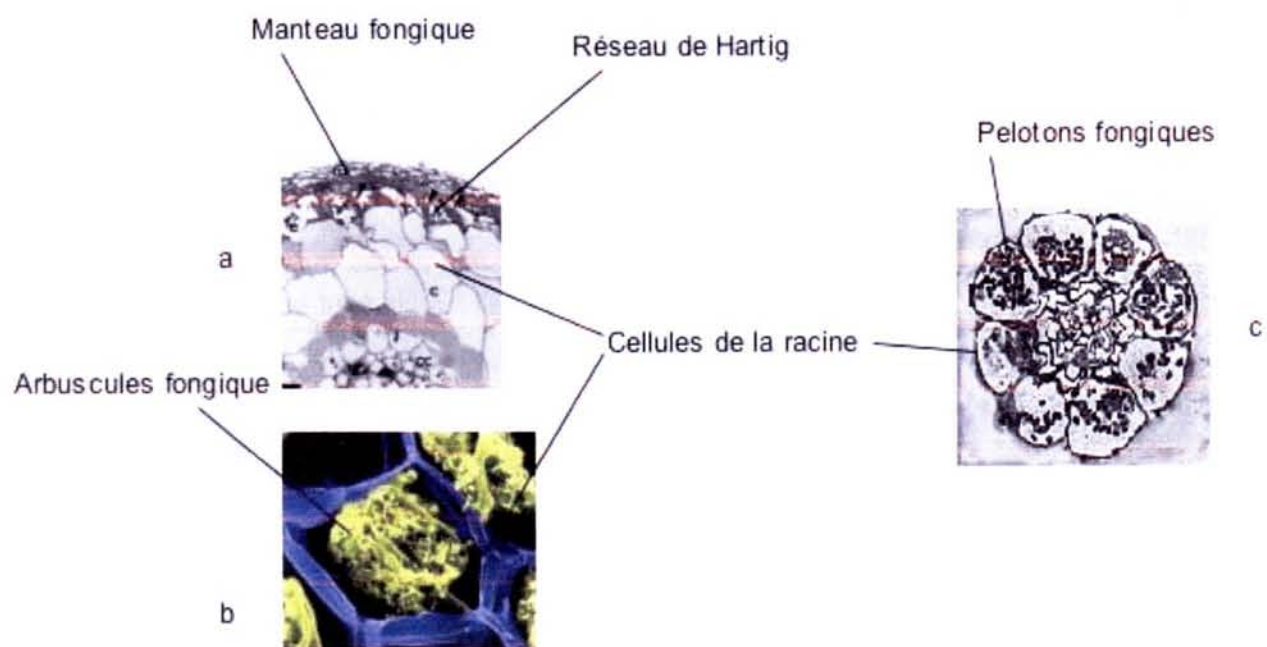


Figure 9. Anatomie microscopique de quelques types de mycorhizes : (a) ectomycorhize, (b) endomycorhize arbusculaire ; (c) endomycorhize à pelotons ericoïde.

Quel peut-être le rôle des mycorhizes dans les écosystèmes ?

Dans les forêts, il existe des interactions plante-plante influençant les processus basiques comme la croissance, mais aussi la reproduction. D'autre part, ces mêmes plantes sont associées à des champignons. Donc, étudier l'effet des champignons mycorhiziens sur les populations de plantes présente des intérêts considérables pour les écologistes, les évolutionnistes et les agronomes. En fait, il est bien connu que les champignons mycorhiziens favorisent la croissance (Smith et Read, 1997) et la reproduction des plantes (Koide, 2000).

Il ne faut pas imaginer qu'un individu fongique ne soit associé qu'à un arbre, la situation est beaucoup plus complexe. En effet, les arbres sont reliés grâce au mycélium fongique, constituant ainsi un réseau : « *wood-wide web* » (Helgason et al., 1998). Ces réseaux mycéliens (*Common mycorrhizal networks* – CMNs), liant les racines compatibles des plantes de la même espèce ou d'espèces différentes, ont été identifiés comme médiateur potentiel de la compétition pour la lumière et pour les nutriments (Read, 1997).

En 1987, Grime et al. suggèrent que les plantes herbacées reliées par les CMNs formés par des champignons endomycorhiziens arbusculaires (AMF) permettent le transfert de carbone (C) de plantes « donneuses » vers des plantes « receveuses » en laboratoire. Simard et al. (1997) ont été les premiers à suggérer que ces transferts sont aussi vrais pour les champignons ectomycorhiziens (ECM). En fait, les CMNs sont courants entre les arbres de la canopée et les plantes du sous-bois qui n'ont pas accès à la lumière (Horton et Bruns, 1998 ; Kennedy et al., 2003). Les CMNs redistribueraient donc les ressources dans les communautés végétales et compenseraient les compétitions interspécifiques, en permettant des flux de C et de nutriments à travers un gradient, des plantes riches en ressources vers les plantes plus pauvres (Booth, 2004). Toutefois, un tel phénomène devrait entraîner une homogénéisation des arbres dans les forêts, mais il ne semble pas que ce soit le cas (Koide et Dickie, 2002). En fait, les flux de C entre plantes via les CMNs sont encore très discutés (Robinson et Fitter, 1999).

Nous avons vu que les CMNs joueraient un rôle important dans la coexistence des espèces végétales par les flux de nutriments qui peuvent exister entre plantes. Mais, ils contribuent aussi au maintien de la communauté végétale, ainsi qu'à sa structure après une perturbation, mais aussi dans les forêts plus âgées (Kennedy et al., 2003). En plus d'avoir un rôle dans l'alimentation minérale du végétal, les mycorhizes, et entre autres les ECM, protègent également la racine hôte contre diverses agressions (Selosse, 1998). Le manteau a un rôle d'écran contre les micro-organismes du sol, mais aussi des interactions plus complexes dans la rhizosphère amènent une modification locale de la microflore (Frey et al., 1997). D'autre

part, la plante hôte accumule des composés antibiotiques en réponse à la mycorhization (Weiss et al., 1997). Enfin, les mycorhizes protègent l'hôte contre les agressions physico-chimiques : tolérance au calcaire (Chevalier et Frochot, 1997), tolérance aux métaux lourds (Leyval et al., 1997), tolérance au stress hydrique (Guelh et al., 1992).

Pour conclure, les populations possèdent des propriétés différentes de celles des individus isolées. Donc, pour connaître l'effet des champignons mycorhiziens dans les forêts, il ne suffit pas d'additionner les effets qu'ils ont sur les individus pris individuellement. Etudier ces champignons dans des populations végétales très complexes est donc fondamental pour les écologistes, qui cherchent à comprendre leur rôle dans les écosystèmes, mais aussi pour les agronomes, qui veulent appliquer ces données à l'agriculture.

1.3.2.2 Les truffes, des champignons ectomycorhiziens

Parmi les premières mycorhizes décrites par Frank (1885), certaines appartenaient à la truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum*). En fait, Frank, physiologiste végétal et forestier, a entrepris ses recherches à la demande du Service Forestier de la Prusse, afin de trouver un moyen d'augmenter la production de truffes dans le royaume. Il a observé que les vraies truffes (*Tuber uncinatum*) et les fausses (*Elaphomyces* sp.) ne se développaient qu'en étroite relation avec certains arbres (hêtres, charmes, chênes). Il en a conclu que « certaines essences forestières, en particuliers les Cupulifères, ne se nourrissaient pas dans le sol de manière indépendante, mais établissaient une symbiose avec un mycélium fongique qui affectait l'intégrité du système racinaire ; ce mycélium avait une fonction nourricière et assurait l'alimentation de l'arbre, à partir du sol » (Frank, 1885).

Dès le début du XX^e siècle, Mattiolo étudie les mycorhizes de truffes, mais il faudra ensuite attendre 1962 pour que des chercheurs italiens de l'Institut de recherches sur les plantes ligneuses de Turin (Fassi et De Vecchi) décrivent pour la première fois avec exactitude les mycorhizes d'un *Tuber* : *T. maculatum*. Quelques années plus tard, Palenzona (1969) décrit les mycorhizes de trois truffes comestibles : *T. melanosporum*, *T. brumale* et *T. aestivum*. Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.2.3.1, c'est dans les années 70 que les premiers plants mycorhizés en pépinière avec *T. melanosporum* ont été obtenus (Chevalier et Grente, 1979). A partir des années 70, les premières synthèses de mycorhizes en conditions contrôlées ont été obtenues (Palenzona et al., 1972 ; Chevalier, 1973). Des travaux plus récents ont permis la réalisation de mycorhizes *in vitro* de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*, *Cistus incanus*, *Alnus cordata*, *Castanea sativa*, *Populus alba* et *Corylus sativa* (Sisti et al., 1998 ; Zambonelli et Branzanti, 1989, 1990 ; Miozzi, 2003).

1.3.2.3 Comment le mycélium reconnaît-il la racine et entre en phase symbiotique = phase pré-symbiotique?

La transition entre la phase saprotrophique et la phase symbiotique est en grande partie inconnue. Toutefois, nous savons qu'il existe des signaux environnementaux, mais aussi des signaux de la plante, qui sont perçus par le mycélium et qui induisent une cascade d'événements moléculaires (Figure 10 ; Martin et al., 2001). La phase de pré-contact provoque donc une série de changements physiologiques conduisant (i) à la reconnaissance des deux partenaires, (ii) à la colonisation de la racine et (iii) à la mise en place par le champignon de mécanismes de détoxification des substances sécrétées par la plante (Martin et al., 2001). Tous ces changements sont accompagnés par des modifications métaboliques très régulées, qui restent encore pour la plupart inconnues.

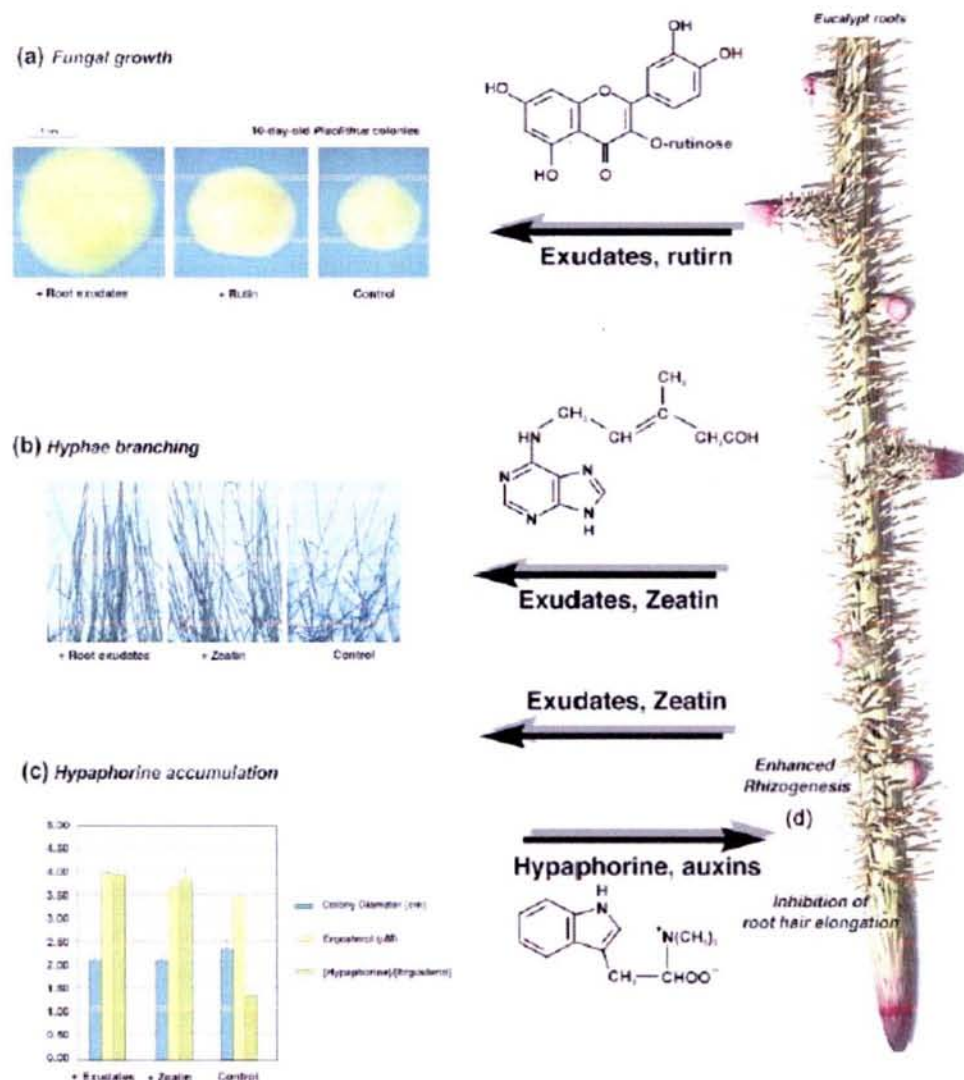


Figure 10. Echanges moléculaires intervenant dans la rhizosphère lors de la colonisation d'*Eucalyptus globulus* par *Pisolithus* (Martin et al., 2001). Les exsudats racinaires altèrent la morphologie du mycélium de *Pisolithus*. Ces changements morphologiques sont induits par le flavonol et la rutine qui stimulent la croissance fongique exprimée par le diamètre des colonies (a). Une faible concentration de Zéatine modifie l'angle d'insertion des hyphes (b) et l'accumulation de tryptophane, bétaïne et hypophorine (c). D'autre part, l'hypophorine et l'auxine sécrétées par *Pisolithus* induisent des changements morphologiques du système racinaire (par exemple l'arrêt de croissance des poils racinaires et stimulent la formation de racines courtes).

Mais quels sont les signaux permettant à la truffe de reconnaître la plante?

Lors de l'étude de la phase pré-symbiotique entre *T. borchii* et *Tilia platyphyllos*, Menotta et al. (2004b) ont identifié des composés volatiles spécifiques de cette phase, parmi lesquels des aldéhydes, des cétones, des alcools et des terpènes. De telles molécules, émises par les plantes, ont déjà été décrites comme favorisant la croissance d'*Aspergillus flavus* (Zéringue et McCormick, 1989). De même, Fries et al. (1987) ont rapporté l'effet chemotropique, des hyphes vers les racines de *Pinus sylvestris*, d'un terpène.

Il est donc possible que ces composés volatils spécifiques aient un rôle similaire en dirigeant les hyphes des truffes vers les racines.

Les sucres sont importants comme source d'énergie, mais aussi comme molécules de signalisation, cela a été montré chez les plantes supérieures (Jang et Sheen, 1997). En fait, une carence nutritionnelle pourrait signaler au mycélium de *Tuber* la présence de la plante, et fonctionner ainsi comme stimulus de la transition de la phase saprotrophique à la phase symbiotique (Soragni et al., 2001).

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.3.1.3, les hexokinases sont régulées par la concentration en sucre. Etant donné qu'elles contrôlent l'expression génique, ces enzymes pourraient jouer un rôle important dans la reconnaissance de la racine et l'instauration de la symbiose. De même, l'analyse de l'expression génique d'un clone (VA51) ayant une forte homologie avec une β -glucosidase montre que son expression est régulée par la présence de glucose, mais aussi par la présence de la plante (Miozzi, 2003). Un rôle dans la perception de la plante hôte est suggéré pour cette enzyme.

Enfin, Soragni et al. (2001) ont étudié l'expression et la localisation d'une phospholipase A2 (TbSP1). Cette enzyme s'est révélée être fortement surexprimée dans du mycélium de *T. borchii* en carence de carbone (80 fois) et d'azote (120 fois) (Figure 11). En revanche, ces auteurs n'ont pas mis en évidence d'effet sur cette protéine de la carence de phosphate. Etant donné que TbSP1 est accumulée au niveau de la paroi cellulaire (Figure 12), elle pourrait avoir un rôle dans les modifications pariétales intervenant lors de la formation de la symbiose (Bonfante et al., 1998). Ce rôle pourrait être direct, en hydrolysant les phospholipides, ou bien indirect, en inhibant certaines enzymes comme la (1-3)- β -glucane synthase (Soragni et al., 2001). Il pourrait aussi s'agir d'une molécule de signalisation durant les premiers stades de colonisation de la plante (Soragni et al., 2001).

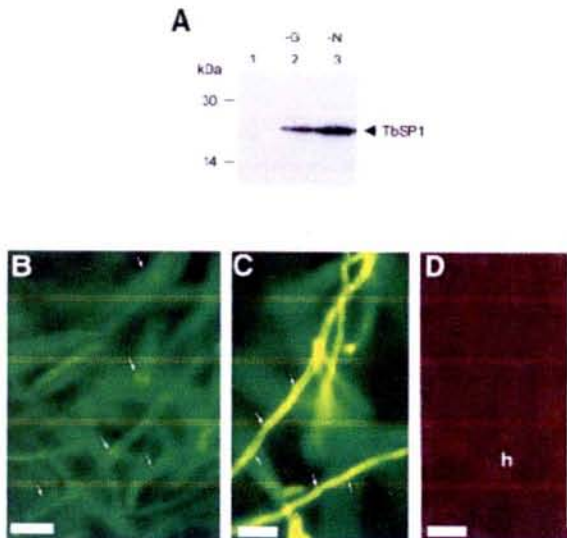


Figure 11. Accumulation de la protéine TbSP1 en condition de carence nutritionnelle dans le mycélium de *T. borchii* (Soragni et al., 2001).

(A) Analyse immunoblot du niveau de TbSP1 dans le mycélium en croissance pendant 31 jours en milieu non carencé (contrôle : ligne 1), en carence de glucose (-G : ligne 2) ou d'ammonium (-N : ligne 3). Les mycéliums des échantillons du contrôle (B) et du carencé -N (C) soumis à une analyse immunofluorescente utilisant un marquage secondaire FITC des anticorps (bars = 18 μm) ; (D) correspond à une section d'hyphes (h) contrôle sans anticorps.

Pour plus de détails voir Soragni et al. (2001).

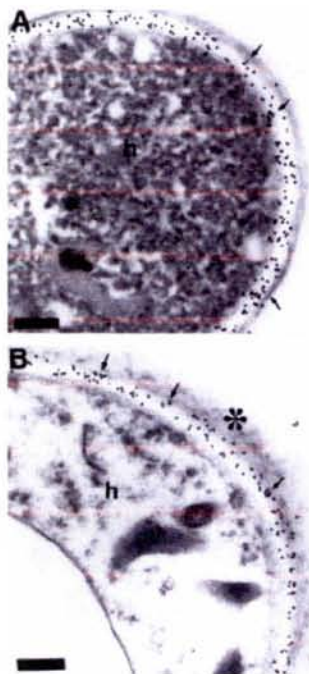


Figure 12. Immunocytolocalisation de la protéine TbSP1 à l'or dans les hyphes du mycélium de *T. borchii* (Soragni et al., 2001).

Immunogold-TEM localisation après 30 jours de croissance dans une section transversale d'hyphe (h) proche de la zone apicale (A) et dans des zones différenciées (B).

Pour plus de détails voir Soragni et al. (2001).

Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase pré-symbiotique ?

Dans une analyse d'expression différentielle de transcrits durant la phase pré-symbiotique, Menotta et al. (2004a) ont identifié 58 gènes régulés lors de l'interaction entre *T. borchii* et *Tilia americana*. Parmi ceux-ci, ces auteurs identifient les transcrits codant la protéine ribosomale 60 S et une cytochrome P450, protéines étant impliquées directement ou indirectement dans la signalisation plante-champignons pour les endomycorhizes

arbusculaires (Gianinnazzi-Pearson et al., 2002). Il semble donc y avoir des mécanismes communs lors de la phase pré-symbiotique, pour les symbioses ecto- et endomycorhiziennes. De même, Menotta et al. (2004a) identifient une GAS-2-like, protéine nécessaire à la virulence de *Candida glabrata* (Weig et al., 2001), étant régulé lors de la phase pré-symbiotique.

1.3.2.4 La morphologie des mycorhizes dépend de la souche et de l'hôte.

La réalisation de mycorhizes de *Tuber in vitro* permet d'analyser la structure morphologique des mycorhizes en fonction des souches fongiques et de l'hôte. Une étude portant sur deux souches de *T. borchii* (1BO et 43BO), formant des mycorhizes avec *Tilia platyphyllos*, montre qu'il existe des caractéristiques morphologiques différentes, mais aussi un effet différent sur la croissance de l'hôte de ces deux souches (Sisti et al., 2003). De même, des mycorhizes de *T. brumale* avec *Tilia americana* et *Quercus pubescens* ont des différences morphologiques, comme la longueur et le nombre de cystides (Giomaro et al., 2002).

Des facteurs génétiques influencent donc la formation, la morphologie et l'effet physiologique sur l'hôte des mycorhizes. Mais, il existe aussi un effet de l'hôte sur la morphologie de cet organe.

Ces résultats confirment que l'identification des *Tuber* dans leur phase symbiotique est difficile car la structure des mycorhizes peut varier en fonction du génotype du champignon, de l'espèce hôte, mais aussi de l'environnement. Il a donc fallu mettre au point des outils permettant l'identification des truffes lors de cette phase du cycle biologique, nous y reviendrons au paragraphe 1.4.2.

1.3.2.5 Quels sont les mécanismes moléculaires et biochimiques présents lors de la phase symbiotique des Tuber ?

Le métabolisme du carbone chez l'ectomycorhize

Comme nous l'avons déjà dit, les sucres utilisés par le champignon proviennent de la plante. Contrairement au mycélium et à l'ascocarpe (Saltarelli et al., 1998), à ma connaissance, les enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates n'ont pas été quantifiées chez l'ectomycorhize de truffe. Toutefois, dans l'ectomycorhize, l'ARNm correspondant à l'énolase de *T. borchii* est détecté (Polidori et al., 2002, 2004). La glycolyse est donc vraisemblablement active dans l'ectomycorhize.

Métabolisme azoté de la phase symbiotique.

Expression des enzymes de la voie d'assimilation de l'azote

Le métabolisme azoté est profondément influencé par les deux partenaires de la symbiose. En effet, Pierleoni et al (2001) ont mesuré, dans les mycorhizes de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*, la capacité enzymatique de plusieurs enzymes du métabolisme azoté : GS, GOGAT et GDH (Figure 8). Les niveaux de GS et de GDH sont supérieurs dans l'ectomycorhize par rapport au mycélium, ce qui suggère que l'assimilation d'ammonium est plus importante dans cet organe (Pierleoni et al, 2001). De même, Vallorani et al. (2002) ont montré que le gène *gdh* fongique est exprimé dans l'ectomycorhize de *T. borchii* avec *Tilia platyphyllos*. Alors que les GDHs des deux partenaires sont présentes dans l'ectomycorhize, l'activité de la GDH à NADP fongique semble supérieure à celle de la plante (Vallorani et al., 2002). La nitrate réductase de *T. borchii* est une autre enzyme qui est surexprimée dans l'ectomycorhize par rapport au mycélium contrairement à la nitrate réductase de *Tilia platyphyllos* qui est moins exprimée dans l'ectomycorhize que dans la racine seule (Guescini et al., 2003). Enfin, Montanini et al. (2003) ont trouvé des niveaux de GS dans l'ectomycorhize comparables à ceux du mycélium en carence azotée (cf § 1.3.1.2). Ces auteurs localisent cette enzyme au niveau des hyphes pénétrant dans la racine. Dans cet organe, la GS aurait un rôle de protection contre les herbicides tel que la phosphinothricine (glufonisate). Les mycorhizes des *Tuber* pourraient ainsi protéger les plantes contre ces substances (Montanini et al., 2003).

Ces résultats montrent que le champignon joue un rôle important dans l'assimilation de l'azote après l'établissement de la symbiose (Vallorani et al., 2002 ; Guescini et al., 2003).

Sous quelle forme l'azote est-il transféré du champignon à la plante ?

La détermination des acides aminés libres dans des racines contrôles et des ectomycorhizes en croissance sur du nitrate révèle de fortes concentrations de glutamate, glutamine et asparagine dans les tissus symbiotiques (Guescini et al., 2003). Ceci a conduit ces auteurs à suggérer que dans la symbiose *T. borchii* - *Tilia platyphyllos*, ces acides aminés représentent les composés azotés servant à transférer l'azote du champignon vers la plante.

Quelles sont les modifications transcriptionnelles intervenant lors de la phase symbiotique ?

De nombreux gènes sont impliqués lors du développement de

l'ectomycorhize. Actuellement, de nombreuses recherches se focalisent sur le développement et le fonctionnement de cet organe. Elles ont pour objectif de comprendre les interactions symbiotiques plantes-champignons (Figure 10 ; Martin et al., 2001). Toutefois, de telles études sont encore rares chez les truffes, et la plupart des gènes impliqués dans leur phase symbiotique sont inconnus.

Afin de mieux comprendre les mécanismes intervenant lors de la phase symbiotique des *Tuber*, Zeppa et al. (2000) ont estimé la biomasse fongique et le niveau de transcrite dans le système *in vitro* *T. borchii-Tilia platyphyllos*. Ces auteurs montrent par dosage de l'ergostérol, que la biomasse fongique et l'activité métabolique diminuent avec l'âge de l'ectomycorhize (Tableau 7). Ceci est confirmé par l'estimation du taux de transcrite par estimation de l'ARN ribosomal, qui n'est pas régulé lors de la symbiose, et par l'analyse des protéines totales par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D PAGE). En revanche, le taux de transcrite augmente chez la plante (Zeppa et al., 2000). Concernant les protéines, ces auteurs notent une diminution des protéines fongiques, ainsi que l'apparition de plusieurs protéines nouvelles, malheureusement inconnues.

Tableau 7. Estimation de la biomasse fongique (dosage de l'ergostérol) et du taux de transcrite fongique (ARNr) dans l'ectomycorhize *T. borchii-Tilia platyphyllos* obtenue *in vitro* (d'après Zeppa et al., 2000).

	Biomasse fongique %	Transcrits fongiques %
Mycélium	100	100
Racine non infectée	0	0
Ectomycorhize jeune	51,45 ± 1,51	42 ± 2,9
Ectomycorhize âgée	35,12 ± 2,21	34 ± 1,7

Dans un travail plus ciblé sur l'analyse transcriptionnelle, Polidori et al. (2002) ont testé, par expression différentielle, 36 ADNc caractérisés à partir de l'ectomycorhize *T. borchii-Tilia platyphyllos*. La comparaison de l'expression de ces clones dans le mycélium, la plante et l'ectomycorhize indique que la majorité d'entre eux présentent une surexpression dans l'ectomycorhize. Parmi ces clones surexprimés, 60 % ne présentent aucune similarité avec des protéines connues. Toutefois, ces auteurs identifient la protéine ribosomale 60 S, une α -cétoglutarate sulfonate dioxygénase, une tyrosine kinase, une nucléoside diphosphate kinase, une sorbitol déshydrogénase, une émolase et une glutaredoxine comme étant fortement régulées lors de la phase symbiotique. Malheureusement, l'origine, champignon ou plante, de ces clones est incertaine. Toutefois, Polidori et al. (2002) suggèrent que la majorité des clones régulés proviennent de la plante, ce qui est en accord avec les résultats de Zeppa et al. (2000).

Pour conclure cette partie sur les mécanismes impliqués dans la phase symbiotique, nous pouvons dire que la multiplication des études et la comparaison des résultats obtenus pour les *Tuber* et les autres espèces ectomycorhiziennes permettent d'identifier plusieurs gènes importants lors de cette phase du cycle biologique (Figure 13). Toutefois, un schéma général de l'expression génique du mycélium à la phase symbiotique n'est pas encore disponible.

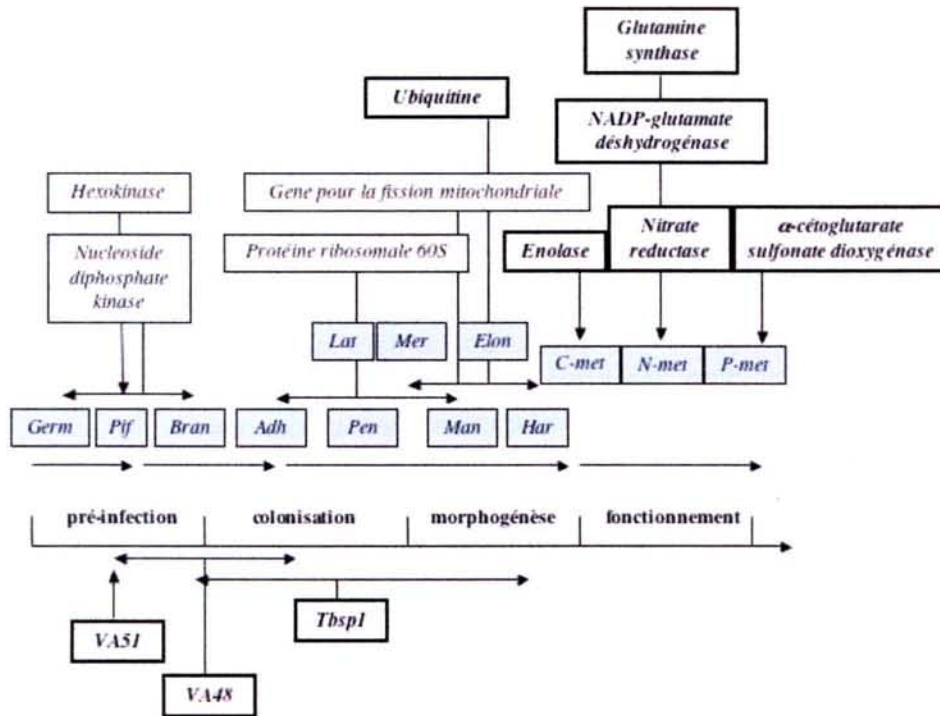


Figure 13. Stades de développement de l'ectomycorhize et expression des gènes impliqués dans les dans les différentes phases de l'interaction symbiotique des *Tuber* (d'après Miozzi, 2003).

Sur la partie supérieure du schéma sont reportés les gènes isolés chez les truffes (Guescini et al., 2003; Guidi et al., 2003; Montanini et al., 2003; Vallorani et al., 2002; Agostini et al., 2001; Lacourt et al., 2002; Pierleoni et al., 2001; Polidori et al., 2002; Zeppa et al. 2001). Sur la partie inférieure sont reportés les trois gènes étudiés par Miozzi (2003): Phospholipase A2 (*Tbsp1*), une protéine riche en cystéine (*VA48*) et une putative β -glucosidase (*VA51*). Les différentes phases du processus de développement de l'ectomycorhize *Pisolithus* et *Eucalyptus* sont indiquées (d'après Martin et Tagu, 1999): *Germ*: germination des spores et des propagules ; *Pif*: pré-infection, croissance des hyphes ; *Bran*: ramification des hyphes ; *Adh*: adhésion des hyphes à la surface de la racine ; *Pen*: pénétration entre les cellules épidermiques ; *Man*: aggrégation des hyphes pour la formation du manteau fongique ; *Har*: différenciation du réseau Hartig ; *Lat*: stimulation de la formation de nouvelles racines latérales ; *Mer*: changement dans les activités méristématiques ; *Elon*: allongement radial des cellules du rhizoderme ; *C-met*, *N-met*, *P-met*: modification du métabolisme du carbone, de l'azote et du phosphate, incluant les transferts entre les symbiotes.

1.3.2.6 Les *Tuber* sont-ils capables de former d'autres types de mycorhizes ?

Dans une étude récente, Selosse et al. (2004) démontrent, pour la première fois, que des Ascomycètes, et entre autres des *Tuber*, forment des endomycorhizes typiques, du point de vue morphologique, avec les orchidées. En effet, 78 % des racines analysées sont colonisées par des

Tuber : *Tuber excavatum* et *T. uncinatum*. Il s'agit du premier rapport d'une plante mycohétérotrophe, *Epipactis microphylla* albinos, ayant comme partenaires des Ascomycètes.

Ceci montre que les truffes sont capables de former d'autres types de mycorhizes.

Il existe d'autres exemples d'espèces fongiques capables de former plusieurs types de mycorhizes. Entre autres, *Amanita gemmata* forme des ectendomycorhizes avec les *Arctostaphylos* spp et des ectomycorhizes avec *Pinus contorta* dans deux populations différentes (Largent et al., 1980a). Largent et al. (1980b) ont, quant à eux, trouvé que les Ericales peuvent former des mycorhizes ecto-, endo- et éricoïdes avec la même espèce de plante (*Arbutus menziesii*). De même, les *Oïodendron*, espèces fongiques éricoïdes, se retrouvent souvent associées avec les racines d'espèces ectomycorhiziennes (Bergero et al., 2000). Récemment, Villarreal-Ruiz et al. (2004) démontrent, pour la première fois, qu'un même mycélium de *Cadophora finlandia* peut développer simultanément des mycorhizes éricoïdes et des ectomycorhizes. Comme suggéré par Vrasltad (2004), il est possible que les arbres des forêts et les plantes éricoïdes soient reliés physiquement par un *Commun Network Mycélium*, d'où un possible transfert de carbone entre ces plantes (cf. § 1.3.2.1).

Dans une étude récente, Gutiérrez et al (2003) montrent que le type de mycorhize qui se forme *in vitro* dépend des conditions culturelles. Des échantillons de racines d'*Helianthemum almeriense*, pris dans la nature, forment des endomycorhizes avec deux Ascomycètes hypogés : *Terfezia claveryi* et *Picoa lefevrei*. Lorsque ces auteurs réalisent des tests de mycorhization en pots, ils observent des ectendomycorhizes, alors que des inoculations *in vitro* donnent des ectomycorhizes. Lors de sa thèse de doctorat, Laura Miozzi a trouvé des résultats similaires avec *T. borchii* et *Gistus incanus* (Miozzi, 2003). Ces travaux montrent, tout d'abord, qu'une espèce fongique est capable de former plusieurs types de mycorhizes. D'autre part, ils indiquent que la situation observée *in vitro* ne correspond pas toujours à ce qui existe dans la nature.

Des études récentes commencent à identifier les mécanismes intervenant lors de la rencontre entre le champignon et la plante. Toutefois, elles sont réalisées sur des systèmes expérimentaux *in vitro* et nous ne savons pas si les mêmes mécanismes sont impliqués dans la nature. De plus, il n'existe pas encore de données physiologiques et fonctionnelles sur les mycorhizes de *Tuber* en conditions naturelles.

1.3.3 La phase reproductive

Nous venons de voir dans les paragraphes 1.3.1 et 1.3.2 les phases saprotrophique et symbiotique du cycle biologique des *Tuber*. Dans ce troisième paragraphe, nous parlerons de la phase reproductive (Figure 5). Cette phase est très importante car elle correspond à la formation du corps fructifère, qui présente souvent un fort intérêt gastronomique et économique (cf. § 1.2.1). Il existe, en fait, beaucoup d'interrogations sur cette phase du cycle biologique :

- (i) Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?
- (ii) Comment se nourrit l'ascocarpe ?
- (iii) Quels sont les gènes conduisant à la différenciation de l'ascocarpe ?

1.3.3.1 Comment se forme et se développe l'ascocarpe ?

Une des principales questions qui intéressent le monde de la truffe est de savoir comment naissent les ascocarpes. Malheureusement nous n'avons pas de réponse simple à cette question. Chez les Ascomycètes, il existe trois stratégies de reproduction : l'hétérothallisme, l'homothallisme et le pseudo-homothallisme (Nelsson, 1996 ; Pöggeler, 2001). Pour le moment nous ne savons pas laquelle est utilisée par les truffes. Cependant, les études de diversité génétique réalisées avec des marqueurs codominants n'ont jamais mis en évidence d'hétérozygotes (Bertault et al., 2001 ; Frizzi et al., 2001 ; Murat, 2001 ; Mello et al., 2002 ; Rubini et al., 2004 ; Paolocci et al., 2004). Cela suggère que les truffes seraient des champignons homothalliques. Dans le cas de l'homothallisme ou autogamie, le mycélium du même individu peut former l'ascocarpe (Pöeggeler, 2001). Donc, les fructifications se formeraient après rencontre du mycélium d'un même individu, malheureusement nous ne disposons pas encore d'un modèle d'étude pour vérifier cette hypothèse. En effet, si en 1969 Fassi et Fontana ont obtenu la formation d'ascocarpes de *T. maculatum* en pots, cette expérience n'a jamais été reproduite (Figure 14). C'est pourquoi, seules les observations *in situ* permettent d'avoir des informations sur les différentes étapes de la formation des fructifications.

Dans ce but, Callot (1999) a étudié une truffière de *T. melanosporum*. Il suggère que l'ascocarpe se formerait au contact des racines longues et, dès les premiers stades de son développement, il n'aurait plus de relations avec le mycélium fructifère. Il évoluerait donc de manière autonome. Cet auteur a proposé un schéma possible pour la formation de l'ascocarpe de *T. melanosporum* (Figure 15).

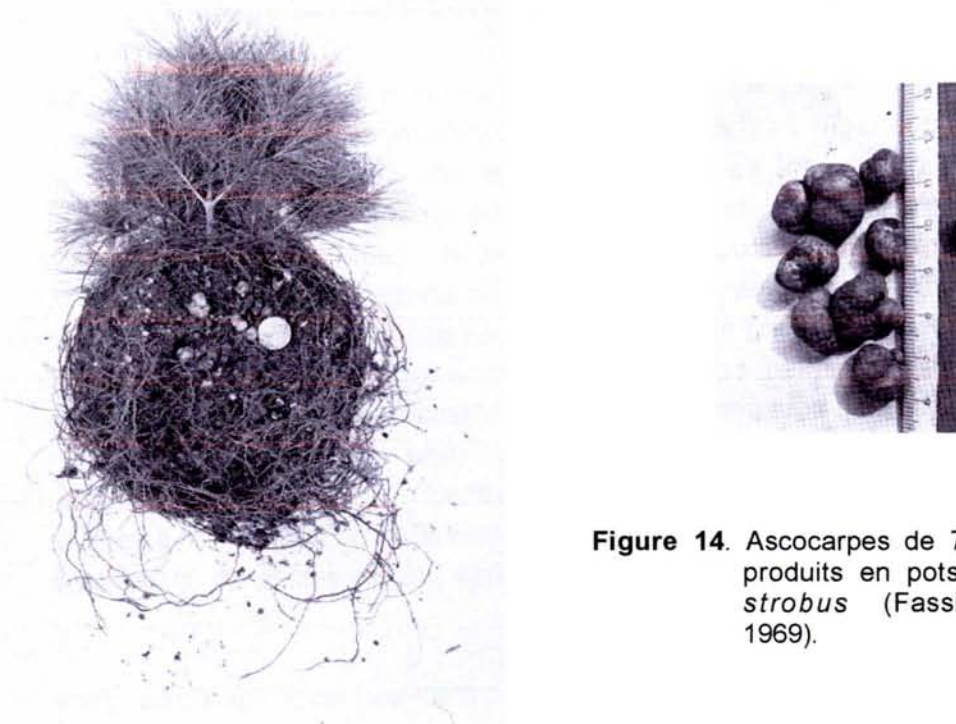


Figure 14. Ascocarpes de *T. maculatum* produits en pots avec *Pinus strobus* (Fassi et Fontana, 1969).

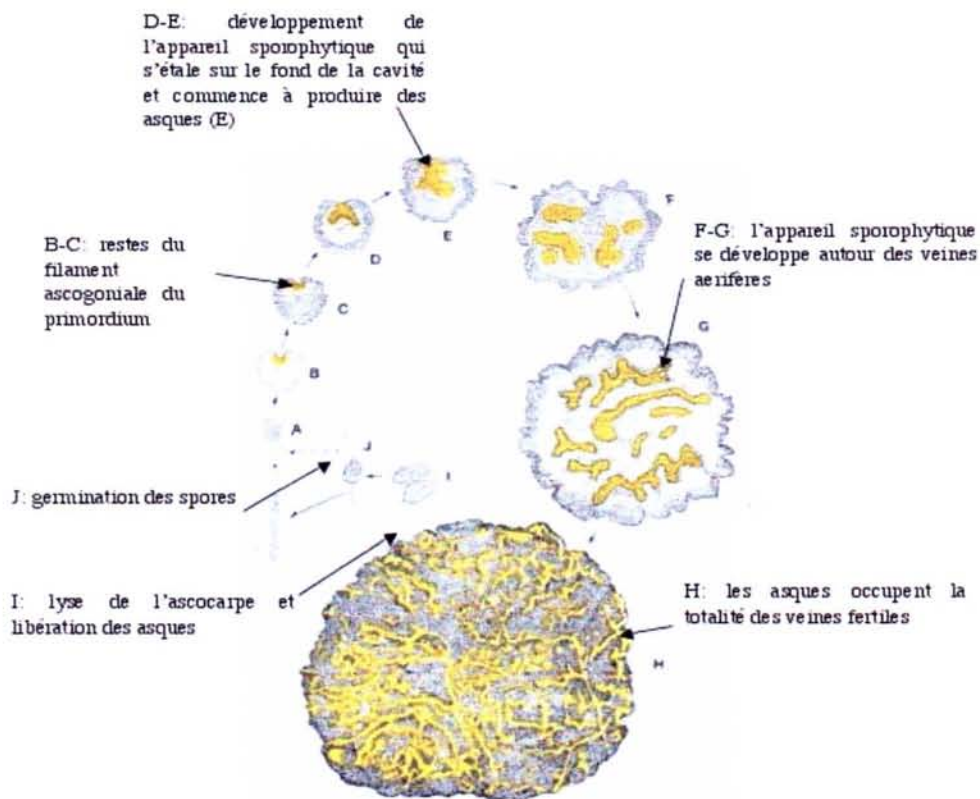


Figure 15. Les différentes phases du développement de l'ascocarpe de *T. melanosporum* (d'après Callot *et al.*, 1999).

A: primordium ; B à F: ébauche apothécioïde en croissance ; G: jeune ascocarpe ; H: ascocarpe mature ; I: asques contenant des ascospores ; J: ascospores en germination.

1.3.3.2 Comment l'ascocarpe trouve-t-il ses nutriments ?

Comme nous l'avons dit précédemment, les ascocarpes se développeraient indépendamment du mycélium et des mycorhizes. Pour cela, ils disposent de houppes mycéliennes qui sont, en général, peu abondantes. Mais chez *T. panniferum*, ces hyphes sont très importantes et recouvrent tout l'ascocarpe (Riousset et al., 2001). Elles sont connues depuis très longtemps puisque Pennier de Longchamps (1766) cite : « *M. de Tournefort prétend que les truffes ont de petits filaments qui leur servent de racines* ». En fait, une analyse réalisée avec des marqueurs radioactifs montre que les houppes mycéliennes des ascocarpes de *T. melanosporum* et *T. aestivum* sont perméables à l'eau, mais elles absorbent aussi un sucre (le mannose) et un anion (le phosphate) (Barry et al., 1994). Donc, ces hyphes seraient responsables de l'absorption de nutriments, il semble aussi qu'elles les redirigent vers des zones préférentielles de l'ascocarpe (Barry et al., 1994).

D'autre part, les truffes interagissent avec d'autres micro-organismes dans le sol, comme des bactéries, des champignons et des levures (cf. § 1.2.2). En fait, les levures trouvées au niveau des ascocarpes les aideraient à se nourrir (Zacchi et al., 2003). En effet, *Cryptococcus humicolus*, qui est fréquemment retrouvé à la surface des fructifications, a des capacités cellulolytique, chitinolytique et proteolytique extracellulaire pouvant aider à la nutrition de l'ascocarpe.

1.3.3.3 Le métabolisme carboné chez l'ascocarpe

Pour avoir des informations sur les voies métaboliques du carbone mises en oeuvre dans l'ascocarpe, Saltarelli et al. (1998) ont comparé l'activité des enzymes de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates dans le mycélium et l'ascocarpe. Cette analyse indique que toutes ces enzymes sont moins actives dans la fructification. Ces résultats suggèrent que la disponibilité en hexose et en oxygène est limitée dans cet organe hypogé. En fait, des observations de terrain montrent que la mésofaune et les crevasses trouvées dans le sol favorisent la fructification, ceci s'expliquerait par une meilleure aération des sols (Callot, 1999).

1.3.3.4 Le métabolisme azoté

En ce qui concerne le métabolisme azoté, la GS et la GOGAT sont détectées dans l'ascocarpe, en revanche la GDH est indétectable (Lacourt et al., 2002 ; Montanini et al., 2003). En fait, la GS semble une enzyme importante car elle est aussi retrouvée lors du développement de la fructification de *Coprinus cinereus* (Ewaze et al., 1978). Cette enzyme est associée à une accumulation d'urée et d'arginine, qui contribuent à l'expansion cellulaire, mais elle conduit aussi à baisser le niveau de NH_4^+

qui est un inhibiteur de la méiose (Moore, 1998 ; Ewaze et al., 1978).

1.3.3.5 Quels sont gènes exprimés lors de la différenciation de l'ascocarpe ?

Les différents tissus et types cellulaires de l'ascocarpe sont le résultat d'un processus de différenciation conduisant à la formation d'asques et de spores. Afin d'avoir des informations sur les gènes impliqués dans ce développement, Lacourt et al. (2002) ont réalisé une analyse différentielle d'expression dans le mycélium et l'ascocarpe à deux stades de maturation (15 et 70%). Ces auteurs identifient 57 gènes régulés dans l'ascocarpe par rapport au mycélium : 41 sont surexprimés et 16 réprimés. Parmi ceux-ci, la GS, la 5-aminolevulinate synthétase, l'isocitrate lyase, la thiorédoxine, la 1,3- β -glucosidase et l'UDP-glucose sont fortement surexprimés. Ces résultats suggèrent que la biosynthèse d'acides aminés, le cycle du glyoxylate et la synthèse de la membrane cellulaire sont fortement altérés durant la morphogenèse de l'ascocarpe. Ce travail a été poursuivi par Silvia Gabella et Simona Abbà qui ont analysé 1858 clones. Parmi les gènes régulés lors de la maturation de l'ascocarpe, elles identifient principalement des enzymes de la biosynthèse des lipides et des « *heat shock* » protéines (Données non publiées).

De même, Zeppa et al. (2002) ont trouvé, par analyse différentielle d'ARNm, 7 clones présentant une expression différente entre le mycélium, l'ascocarpe immature et mature. Parmi ceux-ci, VC12 n'est exprimé que chez l'ascocarpe immature. Ce clone présente une faible homologie ($E = 0,059$; Tableau 1 in Zeppa et al., 2002) avec un gène du *mating-type* (*MAT1*) d'*Alternaria brassicicola*. Il pourrait donc être impliqué dans les processus de fertilisation de l'ascocarpe. Le clone VT19, qui présente une forte homologie avec une 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA réductase de *Gibberella fujikuroi* ($E = 1e^{-25}$), est quant à lui fortement surexprimé chez l'ascocarpe mature. Il pourrait être à l'origine de l'augmentation de la synthèse de l'ergostérol qui est impliqué dans la biosynthèse de nouvelles membranes dans l'ascocarpe. D'autre part, cette enzyme pourrait expliquer l'augmentation de synthèse de composés terpéniques contribuant ainsi à l'arôme des truffes (Zeppa et al., 2002).

Dans une étude plus récente, Zeppa et al. (2004) analysent les composés volatils de l'ascocarpe de *T. borchii* à différents stades de maturation. Ces auteurs montrent que des composés volatiles sont produits à tous les stades de maturation. Chez l'ascocarpe mature, les composés du métabolisme des acides gras comme des alkènes, cétones et alcools sont plus produits que lors des autres stades de maturation. Entre autres, l'1-octen-3-ol est produit à ce stade. Cet alcool serait impliqué dans l'arôme des truffes, mais il jouerait aussi un rôle dans la maturation de l'ascocarpe (Zeppa et al., 2004). L'Aromadendrène est détecté dans l'ascocarpe immature et dans le mycélium de *T. borchii* en contact avec *Tilia*

platyphyllos. En revanche il ne l'est pas dans le mycélium en culture pure. Ceci pourrait indiquer que l'ascocarpe immature échange encore des informations avec la plante (Zeppa et al., 2004).

L'analyse électrophorèse bidimensionnelle des protéines totales (2D-PAGE) a aussi montré des différences au niveau de l'expression des protéines entre l'ascocarpe immature et mature de *T. borchii* (Pierleoni et al., 2004). Cette étude suggère que les stades initiaux de différenciation sont associés à une plus grande activité métabolique que les stades avancés de maturation. De plus, la maturation semble caractérisée par l'apparition et la disparition d'un certain nombre de protéines, malheureusement ces protéines spécifiques de certains stades de maturation n'ont pas été identifiées.

Divers gènes impliqués dans la structure de la paroi cellulaire ont été identifiés dans l'ascocarpe. *Tbf1* code pour une protéine localisée dans la paroi des hyphes de l'ascocarpe de *T. borchii* (De Bellis et al., 1998). Elle est exprimée spécifiquement dans cet organe, indépendamment de son état de maturation. En revanche, elle n'est pas détectée dans le mycélium, ni dans l'ectomycorhize. Etant donné qu'elle est co-localisée avec la chitine et les glucannes, De Bellis et al. (1998) suggèrent que cette protéine pariétale pourrait avoir un rôle structural dans les hyphes de l'ascocarpe.

Chez l'ascocarpe de *T. borchii*, les transcrits des chitine synthase *Chs3* et *Chs4* sont exprimés, en revanche la *Chs2* ne l'est pas (Balestrini et al., 2000). La *Chs3* est principalement localisée dans les asques. Cette enzyme serait donc impliquée dans leur maturation en produisant la chitine servant à leur paroi cellulaire. Au contraire, la *Chs4* se retrouve principalement au niveau de quelques hyphes végétatives, elle aurait donc un rôle dans la formation de la paroi cellulaire de ces hyphes. De plus, cette localisation limitée à certains endroits de l'ascocarpe suggère que la croissance du corps fructifère ne soit en fait qu'un agrandissement de sa forme initiale (Balestrini et al., 2000). Une Chitine synthase de classe IV a été identifiée chez *T. magnatum* (TMchs4) (Garnero et al., 2000). Tout comme la *Chs4* de *T. borchii*, TMchs4 est exprimé dans l'ascocarpe de *T. magnatum*. Il s'agit du premier gène ayant une fonction connue ayant été identifié chez cette espèce.

Pour conclure cette partie sur la phase reproductive des truffes, nous pouvons dire que malgré la multiplication des études, notre méconnaissance des processus induisant et régissant la fructification est totale. L'étude de cette phase de développement est d'autant plus difficile qu'elle n'est pas encore réalisable *in vitro*, il faut donc travailler avec des échantillons pris dans la nature, ce qui n'est pas aisé et ceci pour plusieurs raisons :

1-L'ascocarpe est l'organe des truffes qui coûte cher, surtout si l'on

souhaite étudier *T. melanosporum* ou *T. magnatum*.

2-Pour réaliser des études d'ARN, il faut du matériel frais, c'est-à-dire récolté depuis peu et surtout congelé immédiatement.

3-Les ascocarpes sont colonisés par de nombreux micro-organismes (champignons, levures et bactéries), il faut donc faire attention aux contaminations.

Malgré ceci, nous commençons à mieux connaître la phase reproductive des *Tuber*, qui seraient des champignons homothalliques. Comme nous l'avons vu, plusieurs gènes impliqués dans la différenciation de l'ascocarpe sont connus: la glutamine synthétase, la 5-aminolevulinique acide synthétase, l'isocitrate lyase, la thiorédoxine, glucanne, la 1,3-β-glucosidase, l'UDP-glucose, Tbf1, Ćhs3 et Ćhs4. La synthèse des lipides semble être un processus fondamental lors de la maturation de l'ascocarpe, elle pourrait être impliquée dans les réserves du corps fructifère.

1.3.4 En fait, il persiste des doutes sur le cycle biologique des truffes

En effet, il existe des différences entre les observations réalisées chez les truffes et ce qui est connu pour les Ascomycètes. Par exemple, le nombre de spores par asque est variable et peut même se réduire à 1 pour *T. melanosporum* (Callot, 1999 ; Poma et al., 2002), pour *Neurospora crassa* il est toujours de 8. Chez les Ascomycètes, il existe une reproduction asexuée caractérisée par la formation de conidies encore inconnue chez les *Tuber* jusqu'à cette année (Riousset et al., 2001). En effet, Urban et al. (2004) rapportent l'identification de la phase asexuée de *T. borchii* et de *T. oligospermum*. Etant donné que ces auteurs ne sont pas parvenus à faire germer les conidies, l'appartenance de ces anamorphes à *T. borchii* et à *T. oligospermum* n'a pas été démontrée par culture mycélienne. Toutefois, une éventuelle contamination est réfutée car cinq échantillons indépendants ont été analysés (Urban et al., 2004).

Nous avons tenté, dans ce chapitre 1.3, une synthèse des connaissances sur la biologie des truffes. Ces organismes présentent plusieurs phases dans leur cycle biologique : phase saprotrophique, phase symbiotique et phase reproductive. Les mécanismes impliqués dans chacune de ces phases sont de mieux en mieux connus. Malgré tout, il persiste encore de nombreuses interrogations comme:

(i) Quels sont les facteurs déclenchant les changements de phases ?

(ii) Pourquoi ne réussit-on pas à reproduire la totalité du cycle vital des *Tuber in vitro* avec production des fructifications ?

(iii) La situation *in vitro* correspond-elle à la réalité ?

(iv) Peut on généraliser des résultats obtenus principalement avec *T. borchii* ?

Nous allons dans la quatrième partie de cette analyse bibliographique parler des études de diversité génétique inter- et intraspécifique, nous verrons pourquoi elles sont réalisées et quels en sont les principaux résultats.

1.4 La variabilité génétique : de l'identification des espèces à la phylogéographie

Malgré la multiplication des études morphologiques ayant pour but la séparation des espèces de *Tuber*, il est encore difficile de les identifier sans erreur (cf. § 1.1.3). De plus, le développement de plants mycorhizés, avec diverses espèces de truffes, nécessite la mise au point d'outils d'identification des apex racinaires. Nous verrons dans ce paragraphe les progrès réalisés dans l'identification biochimique et moléculaire des truffes. Nous essayerons de comprendre l'intérêt de ces études de diversité génétique inter- et intraspécifique. Mais nous allons commencer par donner quelques informations générales sur la variabilité génétique, ainsi que sur la génétique des populations.

1.4.1 Variabilité génétique et génétique des populations

1.4.1.1 Concepts généraux et définitions

La génétique des populations, une discipline en plein essor

En 1905, Bateson définissait la génétique comme étant « *la science qui étudie l'hérédité et la variation en cherchant de découvrir les lois qui gouvernent les ressemblances et les différences au sein des individus qui sont en rapports de descendance* » (Piazza, 2003). En fait, la génétique des populations est une branche de la génétique qui mêle observations et théories, dans le but d'expliquer les modifications génétiques survenant au sein des populations et entre les populations (Encadré 4). Elle étudie les mécanismes évolutifs qui régulent l'évolution des populations (Hartl, 1994; Hoekstra, 1996 ; Piazza, 2003).

La variabilité génétique ou polymorphisme : l'outil des études de génétique des populations.

En génétique des populations, ce qui nous intéresse est la part due aux variations entre génotypes (Hartl, 1994). Cette variabilité génétique, au niveau de certaines régions génomiques (loci ou gènes), s'appelle polymorphisme (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/index.htm>). Toutes les formes différentes, c'est-à-dire la séquence de l'ADN d'un locus, sont appelées allèles ou haplotypes (Pons & Petit, 1996 ; Carbone & Kohn, 2001).

Encadré 4 Comment définir le terme de population ?

Le terme de « population » a beaucoup été utilisé dans un sens imprécis, intuitif, pour désigner un groupe d'organismes appartenant à la même espèce. En fait, ce terme désigne plutôt un groupe d'individus de la même espèce vivant dans une zone géographique suffisamment restreinte pour que tous les membres de la population puissent se croiser avec tous les autres (Hartl, 1994). La définition précise d'une telle communauté est difficile et varie d'une espèce à l'autre, puisque les membres d'une espèce sont rarement répartis d'une façon homogène. La subdivision de la population est souvent provoquée par la structuration du milieu ; des zones favorables se mêlent à des zones défavorables. Dans le cas de l'espèce humaine, les chercheurs tiennent compte des villages, villes, régions, états et continents mais ils utilisent aussi beaucoup le paramètre linguistique (Piazza, 2003). Ce morcellement est évident, par exemple, dans le cas d'organismes terrestres sur les îles archipels (Hartl, 1994). En fait la taille des populations est fondamentale, idéalement elle doit être de plus de 100 individus et les populations ayant moins de 50 individus ne devraient pas être prises en compte (Piazza, 2003). Cet échantillonnage est relativement simple quand on travaille sur des organismes faciles d'accès, c'est le cas de l'humain, mais en ce qui concerne les truffes, avoir des populations aussi grandes est difficile.

Chez les champignons, la composition des populations est beaucoup plus difficile à définir. En effet, le concept d'espèce fongique n'est pas encore très clair (cf § 1.4.2). Donc les limites prises pour les populations fongiques sont souvent arbitraires et liées à l'étude menée : parcelle, forêt, département administratif... (Selosse, 1998).

Enfin, les populations naturelles sont rarement simples, donc il est difficile de rechercher et de développer des théories qui correspondent à la réalité (Hey et Machado, 2003). En fait, elles évoluent dans différentes dimensions : elles changent de taille, de densité et de lieu dans le temps, et à travers l'espace, elles peuvent se fragmenter en plusieurs populations et fusionner avec d'autres (= Effet Walhurg) (Hey et Machado, 2003).

Comment révéler la variabilité génétique ?

La variation génétique immédiatement perceptible est relativement rare, par contre, la variabilité génétique cachée est particulièrement répandue. Il a donc fallu mettre au point des outils pour identifier ce polymorphisme : ces outils sont les marqueurs moléculaires (Tableau 8).

Quelles sont les origines et les causes de l'évolution de la variabilité génétique

La variabilité génétique est le résultat de mutations faisant apparaître de nouveaux allèles, auxquelles il faut ajouter les phénomènes de recombinaison (<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/index.htm>). La variabilité génétique au sein des populations peut évoluer sous l'effet de forces évolutives comme les migrations, les mutations, la dérive génétique et la sélection naturelle (Figure 16). Elles entraînent une évolution directrice et non aléatoire des fréquences alléliques. Etudier ces forces évolutives permet de comprendre l'origine et le maintien de la variabilité génétique.

En fait, des facteurs comme la dérive génétique et les « *bottleneck* » (diminution des populations) ont un effet sur tout le génome, alors que la

recombinaison et la sélection n'influencent que quelques parties de celui-ci (Zhang et Hewitt, 2003). Il est donc possible en analysant les séquences d'ADN d'avoir une idée des phénomènes qui sont intervenus dans l'histoire d'une espèce (cf. §1.4.1.2).

Tableau 8. Principales méthodes moléculaires utilisées en écologie (d'après Selosse, 1998).

Méthode	RFLP*	PCR dirigée : SCNG* et SSR	PCR/RFLP (et SSCP*)	AFLP*	RAPD* et RAMS*
		Simple locus		Multi locus	
Principe	Hybridation d'une sonde ADN sur de l'ADN digéré et séparé sur gel	Amplification exponentielle d'un locus délimité par deux amorces flanquantes	PCR suivie d'une digestion par des endonucléases (ou d'une migration en conditions dénaturantes pour la SSCP)	Digestion de l'ADN, ligation de fragments-amorces à certains fragments digérés, puis PCR	PCR sur des loci aléatoirement amplifiés par fixation d'une amorce unique en conditions peu strigentes ; il est possible d'utiliser une amorce microsatellite
Amplification du signal	Sonde radioactive (ou parfois fluorescente)	Amplification <i>in vitro</i> par une enzyme thermostable (<i>Taq</i> polymérase), grâce à la répétition d'un cycle thermique permettant successivement : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces initiant la réplication et enfin la polymérisation			
Base de la spécificité	Choix de la sonde	Choix des amorces et donc du locus, souvent unique. Les conditions thermiques sont déterminantes		Lors de la ligation, choix de certains fragments digérés	Amorces et conditions de température choisies
Source de variabilité	Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments	Variation en taille du locus choisi	Polymorphisme au niveau des sites de restriction et/ou insertions/délétions dans les fragments correspondant au locus choisi	Présence vs absence (marqueurs dominants) ou polymorphisme de taille (marqueurs codominants) de certains fragments amplifiés	
Avantages	Spécifique et reproductible	Très spécifique (donc applicable même quand plusieurs génomes sont présents (par exemple deux symbiontes) et sensible (réclame peu d'ADN). Maintenant, la pcr dirigée est de plus en plus associée à un séquençage direct, mais aussi à un <i>genotyping</i> de microsatellites (SSR)		Amplifie plusieurs loci simultanément ; génère fréquemment de nombreux polymorphismes	
Inconvénients	Manipulation de la radioactivité ; besoin d'une bonne quantité d'ADN	Exige de connaître les séquences des sites d'hybridation des amorces	Coût des enzymes	Amplification de l'ADN contaminant et parfois peu reproductible.	

*abréviations : RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism* ; SCNG : *Single Copy Nuclear Gene* ; SSR : *Simple Sequence Repeats* ; SSCP : *Single-Strand Conformation Polymorphism* ; AFLP : *Amplified Fragment Length Polymorphism* ; RAPD : *Random Amplified Polymorphism DNA* ; RAMS : *Random Amplified Microsatellite Sequences*

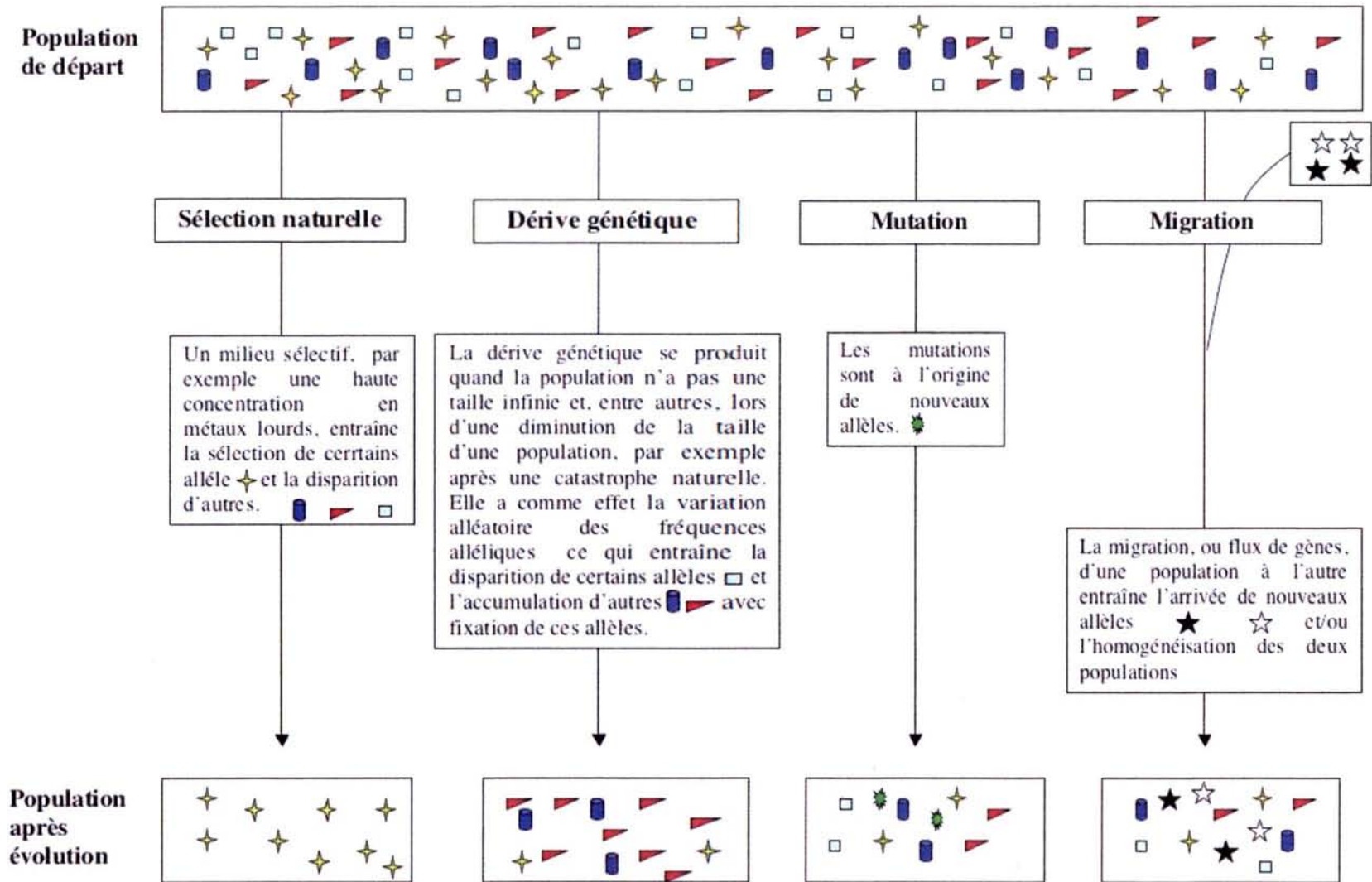


Figure 16. Causes de l'évolution : description des différentes forces évolutives.

1.4.1.2 Pourquoi étudier la variabilité génétique ?

Comme nous l'avons vu précédemment, étudier la variabilité génétique est indispensable en génétique des populations, mais nous pouvons nous demander à quoi servent de telles études. En fait, les applications sont multiples:

- (i) *Elles permettent de réaliser des outils pour identifier les espèces, mais aussi les isolats au sein des espèces.*
- (ii) *Elles sont très utilisées pour faciliter la définition des politiques de conservation des espèces.*
- (iii) *Elles permettent d'étudier les relations entre les espèces et ainsi d'avoir des idées sur leur co-évolution.*
- (iv) *Elles permettent d'étudier les communautés.*
- (v) *Elles permettent d'évaluer le niveau de structuration des populations.*
- (vi) *Elles permettent de reconstituer l'histoire d'une espèce : phylogéographie.*

La variabilité génétique comme outil d'identification des espèces.

Chez les animaux et les végétaux, la définition de l'espèce ne pose pas trop de problèmes. Ce n'est pas le cas pour les micro-organismes et entre autres les champignons (Encadré 5 ; Selosse, 1998). La diversité des organismes, les variations dans les stratégies écologiques et dans les modes de reproduction augmentent les problèmes pour trouver une définition appropriée à tous les champignons (Johannesson, 2000). Le concept d'espèce fongique a évolué depuis une définition strictement basée sur des critères morphologiques, espèce phénétique, vers un concept d'espèce basé sur des études phylogénétiques (Selosse, 1998 ; Johannesson, 2000). Des termes comme taxon (groupe de niveau systématique quelconque) ou stirpe (complexe d'espèces souvent mal démêlées) sont utilisés en mycologie lorsqu'il existe des incertitudes systématiques (Selosse, 1998).

Encadré 5. Que sont les espèces ?

L'espèce peut être définie de plusieurs façons (Ridley, 1996 ; Selosse, 1998) :

- **sens phénétique** : groupe d'organismes partageant des similarités morpho-anatomiques.
- **sens biologique** : groupe d'organismes effectivement ou potentiellement interféconds, qui sont reproductivement isolés des autres groupes de même nature (Mayr, 1975).
- **sens reproductif** : proche du sens biologique, définit l'espèce comme un groupe d'organismes qui partagent un système de reconnaissance commun lors de la reproduction.
- **sens écologique** : groupe d'organismes partageant la même niche écologique.
- **sens cladistique** : groupe d'organismes partageant une origine évolutive commune.

Par exemple, *Laccaria laccata* est un stirpe complexe (Singer, 1977). Chez les truffes, il existe des incertitudes sur la division de certaines espèces, comme le complexe : *T. aestivum*-*T. uncinatum*, nous y reviendrons ultérieurement (Encadré ; §1.4.2.1).

Malgré ces problèmes, les études de la variabilité génétique ont permis la mise au point d'outils pour l'identification des espèces de truffes dans les différentes phases de leur cycle biologique, ainsi que dans les aliments (cf. §1.4.2.1).

La conservation des espèces

La disparition de certaines espèces n'est pas uniquement provoquée par la taille des populations, mais elle est aussi en partie la conséquence de leur faible variabilité génétique (Figure 17). Dans les programmes de conservation, il existe principalement quatre grands problèmes (Steinmetz, 1991): (i) celui de la taille de l'échantillon à conserver, (ii) celui du choix de l'échantillon à conserver, (iii) celui de la dimension des îlots de conservation et (iv) celui de la gestion de ces îlots. Donc, les connaissances sur la diversité génétique, sur la structuration géographique, sur les systèmes de reproduction et les mécanismes biologiques, assurant le maintien et l'évolution de la diversité, sont directement applicables aux modes de conservation.

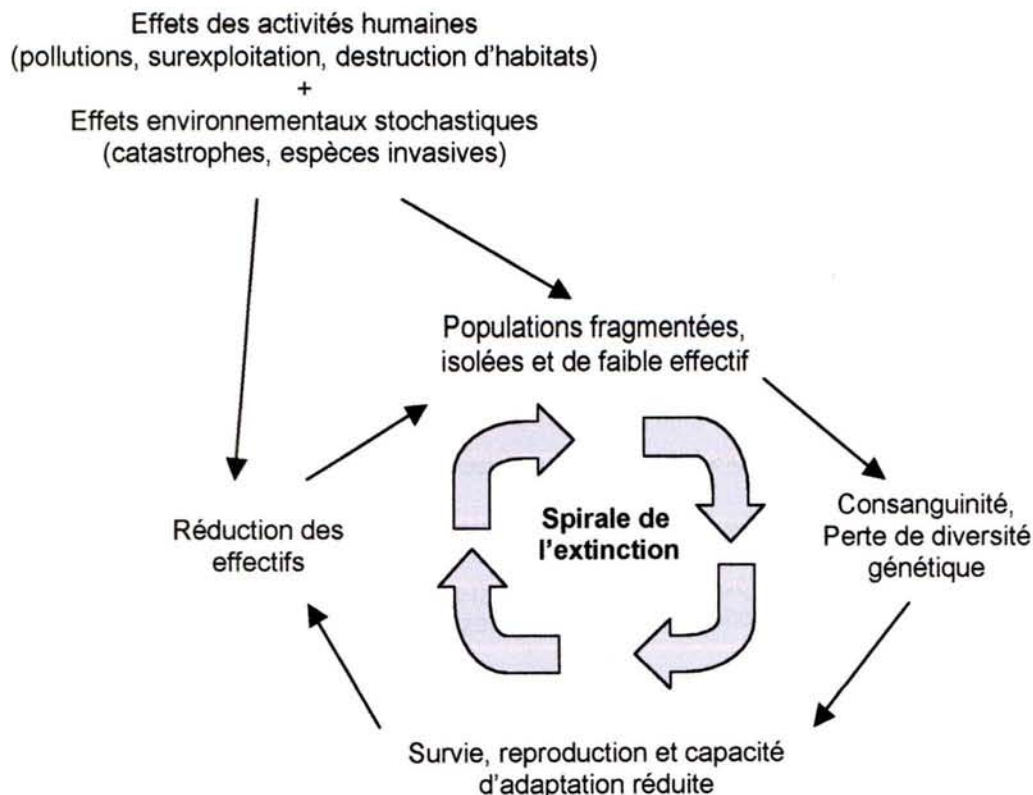


Figure 17. Schéma représentant les principales causes de l'extinction des espèces.

Co-évolution entre les espèces

Darwin, dans son livre « *Origin of Species* », n'a pas employé le terme co-évolution, mais il a utilisé occasionnellement co-adaptation pour décrire l'adaptation de deux organismes (Encadré 6).

Encadré 6. Extrait du livre de Darwin : « *Origin of Species* » p95 1^{ère} édition:

« *Thus I can understand how a flower and a bee might slowly become, either simultaneously or one after the other, modified and adapted in the most perfect manner to each other, by continued preservation of individuals presenting mutual and slightly favourable deviations of structure* »

L'idée de changements réciproques chez deux espèces qui interagissent s'appelle co-évolution (Thompson, 1989). En fait, il existe de plus en plus d'exemple de co-évolution adaptative pour les

symbioses, mais aussi pour les relations hôtes-pathogènes. Ceci montre que les génomes des deux protagonistes sont « liés », faisant de la co-évolution un phénomène fondamental dans l'organisation de la biodiversité (Thompson et al., 2002). Elle peut être mise en évidence, et étudiée, par la comparaison de la structure génétique et de la variabilité génétique des protagonistes (Schardl et al., 1997 ; Jerome et Ford, 2002 ; Thompson et Cunningham, 2002). Toutefois, elle n'entraîne pas toujours une adaptation positive des espèces, mais il est maintenant évident qu'elle est aussi à l'origine d'une « *maladaptation* » (Thompson et al., 2002).

La diversité génétique comme outil d'étude des communautés : exemple des champignons ectomycorhiziens

Chez les champignons ectomycorhiziens, l'étude de la variabilité génétique et de la structure génétique vise, non seulement, à déterminer la structure spatiale mais aussi la dynamique des espèces ou des populations la composant (Horton et Bruns, 2001). Traditionnellement, ces études sont basées sur la récolte des carpophores (Dahlberg et Stenlid, 1994 ; Gryta et al., 1997 ; Bonello et al., 1998 ; Fiore-Donno et Martin, 2001). Mais, depuis l'amélioration des techniques de biologie moléculaire, les échantillonnages de mycorhizes et de sols se sont multipliés (Smit et al., 1999 ; Guidot et al., 2001, 2002, 2004 ; Zhou et Hogetsu, 2002 ; Landeweert et al., 2003 ; Luis et al., 2004). La comparaison entre ces deux types d'échantillonnage indique que les analyses basées sur la récolte des carpophores entraînent un biais et ne correspondent pas toujours à la situation trouvée dans le sol (Dahlberg et al., 1997 ; Jonsson et al., 1999).

Quelle est la dynamique temporelle des champignons ectomycorhiziens ?

En 1998, Franckland définit le phénomène de succession des champignons ectomycorhiziens, se caractérisant par la colonisation, le

maintien et la disparition d'espèces. Généralement, la diversité fongique augmente, via le recrutement de nouvelles espèces, lors des stades précoces puis diminue avec le vieillissement des peuplements (Dalhberg et Stenlid, 1995).

<p>Génet : il correspond à un organisme défini sur la base du génotype</p>

Dans le cadre de cette théorie, les stades précoces de succession se composent d'espèces, appelées « *early stage fungi* », formant de nombreux génets de taille réduite (1 à 10 m) et produisant beaucoup de carpophores et de spores. Ces espèces favorisent la reproduction sexuée. Parmi celles-ci, on trouve *Pisolithus tinctorius* (Anderson et al., 1998), *Hebeloma cylindrosporum* (Gryta et al., 1997) et *Laccaria bicolor* (Selosse et al., 1998a,b).

Au contraire, dans les stades plus tardifs se retrouvent des « *late stage fungi* » se développant principalement par croissance végétative, les génets sont généralement de grande taille (10 à 100 m) et peu nombreux. *Suillus bovinus* (Dahlberg et Stenlid, 1994), *S. pungens* (Bonello et al., 1998) et *S. variegatus* (Dahlberg, 1997) sont des « *late stage fungi* ».

Toutefois, il semble que la situation soit beaucoup plus complexe. En effet, il existe des champignons « *multistage* » comme *S. bovinus* qui est présent à plusieurs stades de maturité de la forêt, mais dans les stades tardifs la taille des génets augmente et leur nombre diminue (Dalhberg et Stenlid, 1994). Pour ce champignon, Dalhberg et Stenlid (1995) suggèrent qu'il colonise le milieu grâce à des basidiospores, colonisation suivie par une croissance végétative du mycélium avec élimination compétitive de certains génets. D'autre part, plusieurs travaux indiquent que la colonisation par spores n'est pas limitée aux stades précoces. Par exemple, *Laccaria amethystina* privilégie la sporulation avec beaucoup de petits génets dans une hêtraie d'altitude (Gherbi et al., 1999 ; Fiore-Donno et Martin, 2001). De même, Redecker et al. (2001) obtiennent des résultats similaires pour plusieurs Russulacées.

Etant donné que la plupart de ces études sont réalisées par échantillonnage des carpophores, elles ne reflètent probablement pas la structure des populations souterraines (réseau mycéliens, ectomycorhizes...) (Jonsson et al., 1999). Toutefois, l'analyse des mycorhizes réalisée pour *Suillus grevillei* associé à *Larix kaempferi* au Japon (Zhou et al., 2001) et pour *Hebeloma cylindrosporum* associé à *Pinus pinaster* (Guidot et al., 2001) montre que la distribution des fructifications et des mycorhizes est liée. Ainsi, la disparition des carpophores est suivie de la disparition des mycorhizes. Cependant, la distribution des mycorhizes ne correspond peut-être pas à la distribution réelle du mycélium dans le sol. Guidot et al. (2002) ont identifié et quantifié le mycélium d'*Hebeloma cylindrosporum* à partir d'extraction d'ADN de sol.

Ces auteurs détectent ce champignon jusqu'à 50 cm des fructifications, au-delà il n'est plus détectable. De même, un an après la fructification *H. cylindrosporum* n'est plus retrouvé (Guidot et al., 2003).

Ceci indique que ce champignon est éliminé, en milieu forestier, du sol et des racines et qu'il recolonise chaque année le milieu grâce aux basidiospores.

Malheureusement, si le nombre d'études portant sur les communautés fongiques au niveau des mycorhizes et du sol se multiplie, il en existe encore peu qui se focalisent sur une espèce pour voir sa distribution et sa diversité génétique.

Subdivision des populations et structure génétique

En fait, les populations naturelles correspondent rarement à une population de taille infinie où les individus peuvent s'unir aléatoirement sur l'ensemble de l'aire de répartition. Les populations sont donc presque toujours subdivisées géographiquement en unités dans lesquelles les individus s'unissent plus souvent avec des individus proches qu'éloignés géographiquement, ces unités sont appelées des dèmes (Hartl, 1994). Souvent le terme de populations est employé à la place de dème (Encadré 4).

Cette subdivision des populations correspond à une structuration géographique, appelée aussi structure génétique.

Etant donné que la dérive génétique va agir différemment dans chaque population, elles vont progressivement se différencier les unes des autres. Cela aura pour conséquence d'avoir des allèles spécifiques pour certaines populations, ainsi que des fréquences alléliques différentes dans chacune d'elles.

Il existe plusieurs techniques permettant de mettre en évidence une différenciation génétique, c'est-à-dire des variations dans les fréquences alléliques entre populations.

Encadré 7. Niveau de structuration génétique basé sur les valeurs de *Fst* (Wright, 1978) :

0,00 < *Fst* < 0,05 = faible différenciation génétique
 0,05 < *Fst* < 0,15 = moyenne différenciation génétique
 0,15 < *Fst* < 0,25 = forte différenciation génétique
 0,25 < *Fst* = très forte différenciation génétique

L'indice de fixation (*Fst*) est un des plus utilisés (Wright, 1978). Le *Gst* est un indice correspondant au *Fst*, c'est-à-dire qu'il est basé seulement sur les fréquences alléliques, alors que le *Nst* est basé non

seulement sur les fréquences alléliques mais aussi sur les différences entre haplotypes (Pons et Petit, 1996). Comme nous le verrons un peu plus loin,

ces indices sont fondamentaux pour avoir des informations sur l'histoire d'une espèce.

La diversité génétique peut permettre d'avoir des informations sur l'histoire d'une espèce.

Il existe divers facteurs pouvant être à l'origine de la différenciation génétique. Des facteurs environnementaux comme le type de sol sont importants pour les champignons (Diez et al., 2001 ; Jany et al., 2002). Mais il existe aussi des facteurs historiques comme la fragmentation ancestrale des populations et une re-colonisation rapide (Figure 18). Si l'on est capable d'identifier l'origine de la différenciation génétique, cela donnera des indications sur l'histoire de l'espèce. Ceci est important si l'on dispose de peu de données fossiles, comme c'est le cas pour les champignons.

Comment peut-on révéler ces facteurs ?

Les marqueurs moléculaires, et surtout les séquences d'ADN, sont utilisés pour révéler la structure génétique, l'histoire évolutive et l'évolution des populations (Zhang et Hewitt, 2003). Cela permet entre autres de révéler

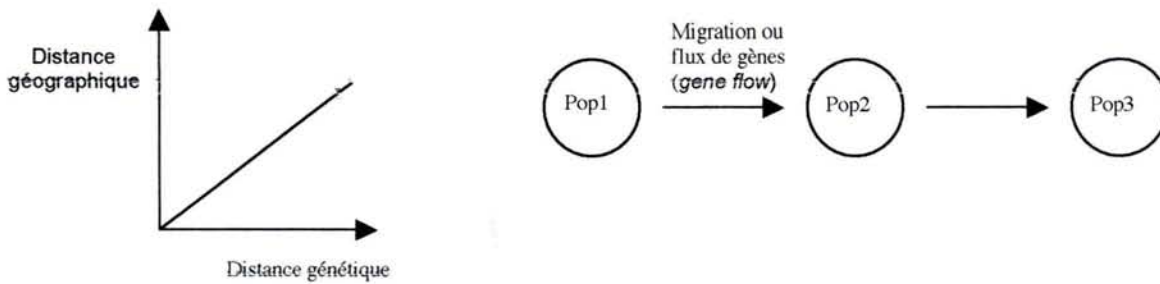
l'histoire démographique d'une espèce (Encadré 9; Emerson et al., 2001), d'étudier les mécanismes de l'évolution comme la recombinaison (Posada et Crandall, 2001), la sélection (Zhang et Hewitt, 2003) et la phylogéographie (Avisé, 1998 ; Hare, 2001).

Encadré 8. Définition de phylogéographie :

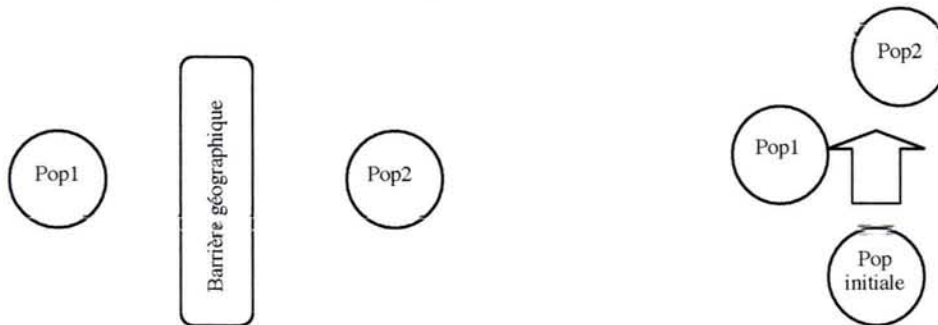
Ce terme a été employé pour la première fois par Avisé (1987). Cette discipline fait partie de la **biogéographie** et elle s'intéresse à l'influence des facteurs historiques sur la distribution actuelle des haplotypes (=structure génétique). Au contraire, l'**écogéographie** s'intéresse aux facteurs contemporains sur la distribution actuelle des haplotype

Parmi les facteurs qui peuvent influencer la structure génétique, l'isolement par la distance (Figure 18) est relativement simple à mettre en évidence. En effet, il suffit de tester une corrélation entre les distances génétiques, pouvant être des indices de similarité ou même les *Fst* entre populations, et les distances géographiques. Pour cela, le test de Mantel est couramment employé (Mantel, 1967).

Mais il faut faire attention à la signification de ce test. En effet, un résultat non significatif indique seulement que l'isolement par la distance n'est pas impliqué, mais il peut très bien y avoir une différenciation génétique et donc par conséquent une structure génétique !



A. Isolement par la distance (*isolation by distance*) : cela se produit quand il existe des événements de migrations successifs, dans ce cas il existe corrélation entre les distances génétique et géographique.



B. Fragmentation de populations (*population fragmentation*) : quand les populations sont séparées et donc sans flux de gènes elles évoluent indépendamment

C. recolonisation rapide (*range expansion*) : quand une recolonisation rapide du milieu s'effectue à partir d'une population

Figure 18. Facteurs à l'origine de la différenciation génétique.

Encadré 9. La théorie de la coalescence : une approche rétrospective (http://anthro.unige.ch/GMDP/Laurent/GMDP_coal.htm).

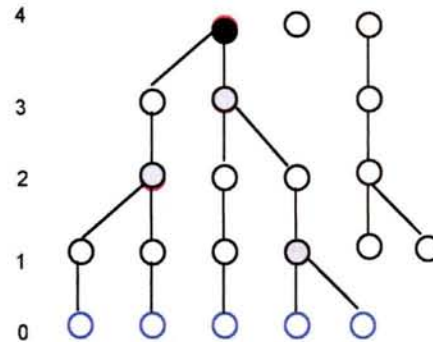
L'approche classique de la génétique des populations consiste à essayer de prédire l'évolution du polymorphisme génétique dans une population sous l'influence de différentes forces évolutives. C'est donc une **approche essentiellement prospective**. Une fois que l'on a compris ce qui se passe au niveau de la population, il faut encore développer la théorie qui concerne des échantillons tirés de la population, car c'est le matériel que l'on observe.

La théorie de la coalescence a une approche entièrement différente. Elle part d'un échantillon de gènes observés, et vise à reconstruire l'histoire généalogique de ces gènes, selon une certaine histoire démographique de la population et un certain modèle de mutation, jusqu'à l'ancêtre commun le plus récent de ces gènes. On n'a donc pas besoin de modéliser l'ensemble de la population. On se préoccupe uniquement de notre échantillon. C'est une **approche essentiellement rétrospective**

La théorie de la coalescence décrit donc simplement le processus de coalescence des gènes d'un échantillon depuis la génération présente jusqu'à l'ancêtre commun de tous les gènes d'un échantillon.

Encadré 9. suite...

Pour simplifier, considérons une très petite population de taille constante contenant 5 gènes à la génération 0 sur la figure suivante :



En remontant dans le passé, on voit que les lignages vont progressivement fusionner les uns avec les autres par une série de coalescence, jusqu'à un seul ancêtre commun, à la génération 4. Donc tous les gènes de la génération 0 ont un ancêtre commun 4 générations auparavant. Maintenant, si l'on regarde le processus, on voit qu'un des gènes de la génération 4 s'est fixé dans la population à la génération 0. Les autres gènes de la génération 4 se sont perdus, ils n'ont pas été transmis jusqu'à la génération présente. Ce processus de fixation d'un gène et de perte des autres gènes est en fait exactement le processus de dérive génétique. **On voit donc que le processus rétrospectif de coalescence est entièrement analogue à un processus prospectif de dérive génétique.** Mais il a deux avantages principaux par rapport au processus de dérive :

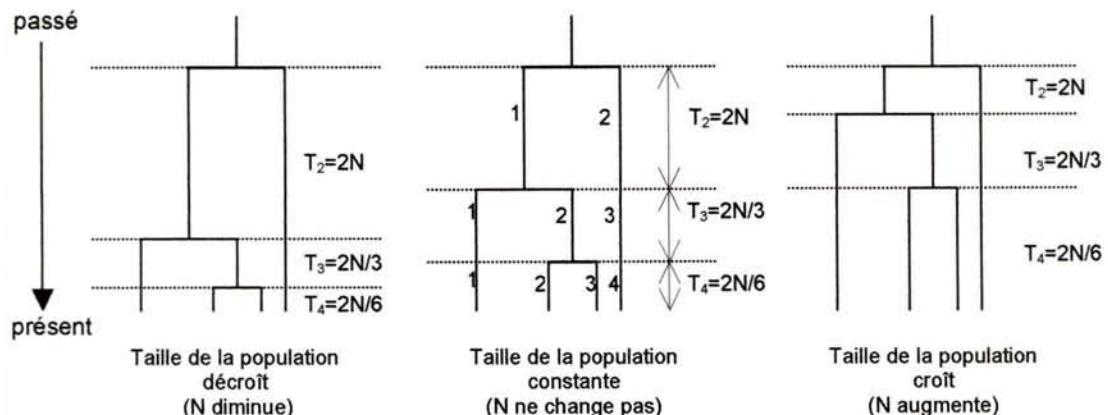
1. On ne va **s'intéresser qu'aux lignées qui laisseront des descendants** à la génération actuelle.
2. On ne va **considérer qu'un échantillon tiré au hasard** de la population, et pas la généalogie de la population entière.

Cette théorie a beaucoup d'applications, elle permet entre autres d'avoir une idée sur l'histoire démographique d'une espèce. En effet, un changement de taille d'une population laisse une signature sur l'ADN (substitution entre individus) qui dépend de la direction du changement (diminution ou augmentation) et du temps (récent ou ancien). Donc découvrir la relation entre le temps de coalescence et la taille des populations est fondamental en génétique des populations (Emerson et al., 2001).

En fait, la topologie des généalogies peut donner une indication sur la démographie. En effet, le temps entre deux moments de coalescence est défini par la formule :

$T_j = 4N/(j(j-1))$, j correspond au nombre de lignées et N à la taille de la population.

Comme le montre l'exemple ci-dessous, le temps de coalescence (T) dépend de la taille de la population et il est ainsi possible de savoir si une modification démographique est intervenue dans le passé.



En revanche, les facteurs historiques sont beaucoup plus difficiles à identifier. Les techniques traditionnelles basées sur les *F-statistiques* (Wright, 1978) ne permettent pas de différencier les facteurs à l'origine de la structure génétique (flux de gènes ou facteurs historiques ; Figure 18) (Templeton, 1998). Pour pouvoir les séparer, il existe un certain nombre de techniques qui sont principalement basées sur des arbres faits à partir des gènes (*gene tree*) (Templeton et al., 1995 ; Templeton, 1998 ; Posada et Crandall, 2001; Knowles et Madison, 2002).

Enfin, si initialement les études de phylogéographie étaient réalisées avec l'ADN mitochondrial (Avice, 1998), il est maintenant acquis que l'ADN nucléaire peut être utilisé (Hare, 2001 ; Zhang et Hewitt, 2003).

Comme nous venons de le voir, étudier la diversité génétique est fondamental pour mieux connaître une espèce. Je vais maintenant tenter de donner un aperçu des études biochimique et moléculaire qui ont fourni de nouveaux outils d'identifications des truffes, mais aussi une idée sur la diversité génétique de quelques espèces de *Tuber*.

1.4.2 Les nouveaux outils d'identification des *Tuber*

Les truffes ont donné lieu à un certain nombre d'études et cela depuis plusieurs siècles (§ 1.1.3). Elles se sont basées, dans un premier temps, sur l'observation des différentes espèces au microscope et à la réalisation de clefs pour l'identification de celles-ci. Ces clés sont basées sur les caractéristiques du péridium (aspect, couleur, dimensions) et sur celles des spores (forme, ornementation). Cependant il persiste quelques cas où les similitudes morphologiques rendent l'identification difficile, c'est le cas pour *T. aestivum*-*T. uncinatum*, *T. brumale*-*T. moschatum*, *T. melanosporum*-*T. hiemalbum* (Figure 3 ; Chevalier et al., 1985 ; Rioussset et al., 2001). Ces problèmes sont d'autant plus importants si l'on souhaite identifier les mycorhizes et non les ascocarpes. C'est pourquoi, depuis le début des années 1980, des techniques biochimiques mais aussi moléculaires ont été mises au point pour l'identification des *Tuber*.

1.4.2.1 Méthodes Biochimiques

Analyse des protéines totales

Mouchès et al. (1978) ont montré que l'analyse électrophorétique monodimensionnelle des protéines constitutives des corps fructifères peut être utilisée comme critère taxonomique chez les champignons supérieurs. Dans le cas des truffes, Mouchès et al. (1978, 1981) ont trouvé que chaque espèce de *Tuber*, identifié morphologiquement, correspond à un profil électrophorétique spécifique. D'autre part, l'analyse bidimensionnelle des protéines de *T. melanosporum* et *T. moschatum* montre que seulement 55% des protéines ont une migration identique d'une espèce à l'autre (Mouchès et al., 1981).

Cette méthode a permis de différencier Tuber melanosporum, T. moschatum, T. brumale, T. excavatum et même T. uncinatum de T. aestivum, ce qui n'est pas le cas avec d'autres méthodes, comme nous le verrons ultérieurement (Encadré 10).

Dupré et al. (1985) ont repris les analyses de Mouchès et al. (1978, 1981) avec un plus grand nombre d'échantillons français et italiens. L'analyse monodimensionnelle confirme les résultats antérieurs pour quatre espèces déjà étudiées : *Tuber melanosporum*, *T. uncinatum*, *T. excavatum*, *T. aestivum* ; mais aussi pour cinq nouvelles espèces : *T. macrosporum*, *T. magnatum*, *T. malençonni*, *T. mesentericum* et *T. rufum*. En revanche, les résultats divergent pour *T. brumale* et *T. moschatum*, ils confirment leur appartenance à la même entité (Dupré et al., 1985).

Dupré (1997) s'est intéressée au profil polypeptidique du mycélium de neuf isolats de *Tuber*. Comme dans le cas des ascocarpes, le spectre protéinique des mycéliums peut constituer un critère d'identification. Cependant, il a été impossible d'établir une correspondance entre les profils protéiniques provenant des ascocarpes et ceux des cultures mycéliennes (Dupré, 1997). Ceci montre bien que le métabolisme est différent dans ces deux phases du cycle biologique des truffes (cf. § 1.3). En revanche, l'utilisation de cette technique au niveau des mycorhizes pose des problèmes pouvant être dus à l'interaction entre le champignon et la plante (Dupré, 1997).

Donc, l'analyse des protéines totales a permis l'identification des corps fructifères de plusieurs espèces de Tuber, mais cette technique n'a pu être utilisée au niveau des mycorhizes. Cependant, elle pose pas mal de problèmes puisque les profils sont souvent difficiles à interpréter, elle nécessite de grandes quantités de matériel et les résultats peuvent varier en fonction de l'état physiologique du matériel. Elle a donc été rapidement

oubliée au profit d'une autre analyse biochimique plus simple : l'analyse des isoenzymes.

Analyse des Isoenzymes

Les isoenzymes sont des enzymes ayant un substrat commun, mais qui diffèrent par leur mobilité électrophorétique. En fait, elles peuvent correspondre à l'expression de plusieurs gènes situés sur plusieurs loci, aux produits d'une même protéine ayant subi des transformations ou des molécules synthétisées par un même gène ou un groupe de gènes et ayant subi des modifications post-traductionnelles. Elles reflètent donc l'expression des gènes. Les isoenzymes sont utilisées pour identifier les espèces de truffes mais aussi pour étudier la variabilité génétique, nous reviendrons dans le § 1.4.3 sur ces études.

C'est en 1988 au Congrès International sur les Truffes que Palenzona et al. présentent, pour la première fois, l'utilisation des isoenzymes pour identifier les espèces de truffes. Pacioni et Pomponi (1989, 1991) et Gandeboeuf et al. (1994) ont montré qu'il est possible de séparer chaque espèce de *Tuber* par son profil enzymatique et, entre autres, *T. aestivum* et *T. mesentericum*, confirmant ainsi les données morphologiques (Pacioni

Superoxide dismutase : SOD
Malate deshydrogenase : Mdh
Isocitrate deshydrogenase : Idh
6-phosphogluconate deshydrogenase : 6-Pgdh
Glutamate deshydrogenase : Gdh
Menadione reductase : Mr
Asparate aminotransferase : Aat
β -glucosidase : β -Glu
Leucine aminopeptidase : Lap
Peptidase : Pep
Mannose phosphate isomérase : Mpi
Glucose phosphate isomérase : Gpi
Phosphoglucomutase : Pgm

et Pomponi, 1991). Parmi les enzymes utilisées, les profils enzymatiques obtenus par le système SOD sont homogènes au sein d'une même espèce et hétérogènes entre espèces différentes (Gandeboeuf et al., 1994 ; Chevalier et al., 2000). Gandeboeuf et al. (1994) ont réussi à différencier *T. brumale* de *T. moschatum*.

Urbanelli et al. (1998a) ont réalisé l'analyse de 18 loci enzymatiques (Mdh-1, Mdh-2, Idh-1, 6-Pgdh, Gdh, Mr-1, Sod-1, Sod-2, Sod-3, Aat-1, Aat-2, β -Glu, Lap, PepC, PepD, Mpi, Gpi et Pgm), sur 835 ascocarpes récoltés dans 26 localités espagnoles, françaises et italiennes. Ces auteurs identifient 20 types électrophorétiques qui se regroupent en 7 groupes correspondant à 7 espèces de truffes (Figure 19).

En revanche, ils n'ont pas pu différencier *T. aestivum* de *T. uncinatum*, confirmant ainsi les résultats de Pacioni et Pomponi (1991) et de Pacioni et al. (1993).

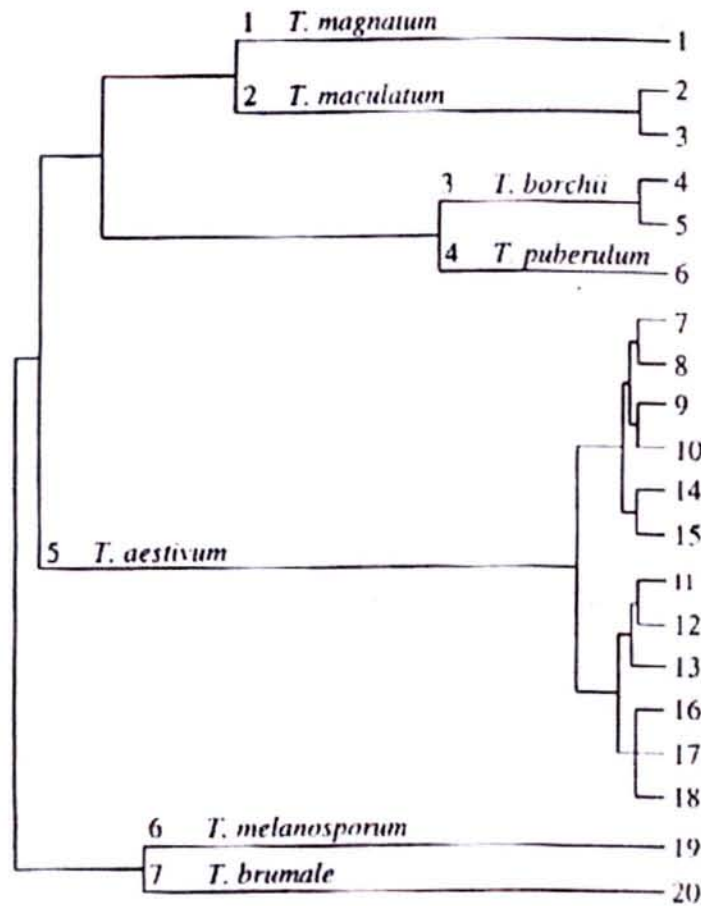


Figure 19 Dendrogramme UPGMA, généré avec les distances génétiques de Nei, montrant les relations entre les 20 types enzymatiques et permettant de séparer 7 taxons de *Tuber* (d'après Urbanelli et al., 1998a)

De même, Dupré (1997) n'a pas pu séparer ces deux taxa en analysant 5 systèmes enzymatiques (Acp, Gdh, Gpi, Mdh et Sod), or ils avaient pu être séparés par l'analyse des protéines totales (Mouchès et al, 1981 ; Dupré et al., 1985). Urbanelli et al. (1998a) ont aussi rencontré des difficultés pour séparer *T. brumale* et *T. moschatum* alors que Gandeboeuf et al. (1994) et Dupré (1997) sont arrivés à séparer ces deux taxa qui ne peuvent être différenciés que par l'odeur des corps fructifères (Riousset et al., 2001).

Contrairement à l'analyse des protéines totales, les 5 systèmes enzymatiques étudiés par Dupré (2000) montrent une parfaite correspondance entre les cultures mycéliennes et les ascocarpes.

D'autre part, les isoenzymes peuvent être utilisés au niveau des mycorhizes. Urbanelli et al. (1998b) ont analysé quatre systèmes enzymatiques (NADP-Gdh, β -Glu, Gpi et Pgm-1) permettant ainsi l'identification des mycorhizes de *T. melanosporum*, *T. aestivum* et *T.*

magnatum. De même, Dupré (1997) montre qu'il est possible d'analyser la NADP-Gdh au niveau des mycorhizes, mais le nombre d'apex nécessaire pour avoir une activité enzymatique suffisante s'est révélé important, ce qui rend difficile l'utilisation de cette technique.

Les méthodes d'analyse biochimique ont permis, pour la première fois, de vérifier la clé de classification morphologique des Tuber. De plus, elles sont applicables sur des cultures pures de mycélium, voire sur des apex racinaires. Cependant, malgré cela elles présentent des contraintes expérimentales limitantes: elles nécessitent de grosses quantités de matériel et ce dernier ne doit pas avoir subi de modifications. De plus, elles n'ont pas permis de régler certaines ambiguïtés taxonomiques comme cela est le cas pour T. uncinatum et T. aestivum et elles ne sont pas très efficaces pour identifier les mycorhizes. Il a donc fallu se pencher sur de nouvelles techniques plus performantes comme l'analyse moléculaire du génome.

1.4.2.2 Méthodes moléculaires

Méthodes d'amplification aléatoire

C'est Lanfranco et al, qui, en 1993, commencent à utiliser les techniques de biologie moléculaire pour la caractérisation des *Tuber*. En effet, ces auteurs ont mis en évidence un haut degré de diversité interspécifique par amplification RAPD (la similarité des profils interspécifiques est comprise entre 2,5% et 17,4%) pour six espèces de *Tuber* : *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. albidum*, *T. aestivum*, *T. macrosporum* et *T. rufum*. En revanche, le niveau de diversité intraspécifique pour *T. magnatum* est beaucoup plus faible (similarité entre les profils de 80 à 90%). Cette même technique a été utilisée par Potenza et al. (1994) pour l'identification de *T. magnatum*, *T. maculatum* et *T. borchii*. Ces auteurs ont réussi à identifier un fragment spécifique de *T. magnatum*. Dans un second temps, ce fragment a été utilisé comme sonde pour l'identification des ascocarpes par hybridation.

Comme nous l'avons vu, la RAPD peut être utilisée pour différencier plusieurs espèces de *Tuber*, surtout celles ayant un niveau de diversité intraspécifique faible comme *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. brumale* et *T. moschatum* (Gandeboeuf et al., 1997 ; Chevalier et al., 2000). Cependant il existe des problèmes avec les espèces ayant un haut niveau de diversité intraspécifique comme, par exemple, *T. aestivum*, *T. uncinatum*, *T. borchii*, *T. rufum*, et *T. excavatum* (Gandeboeuf et al., 1997 ; Dupré, 1997). D'autre part, la RAPD présente plusieurs désavantages. Tout d'abord, elle ne peut pas être utilisée au niveau des mycorhizes car

lors de la PCR, l'ADN de la plante est aussi amplifié. Il existe aussi des problèmes de contamination des profils par l'ADN d'autres organismes (bactéries, champignons, levures) comme cela a été montré par Rabouam et al. (1999) et Murat (2001). Enfin, il peut aussi y avoir des problèmes de reproductibilité des profils. Ceci a conduit Longato et Bonfante (1997) à utiliser une autre technique dérivée de la RAPD, la RAMS (Tableau 8). Au lieu d'utiliser une amorce arbitraire, ces auteurs utilisent une amorce microsatellitaire (GTG)₅ qui a permis de différencier les 11 espèces de truffes étudiées. Cette même amorce a été utilisée par Murat (2001) pour identifier *T. melanosporum*, car elle permet de mettre en évidence d'importantes variations intraspécifiques, alors que les profils obtenus pour cette espèce (= intraspécifique) sont très homogènes.

Enfin, Mello et al. (2002) ont réussi à distinguer *T. uncinatum* de *T. aestivum* en utilisant les amorces (GTG)₅, (GAC)₅, (AAG)₈ et (AAC)₈ (Figure 20).

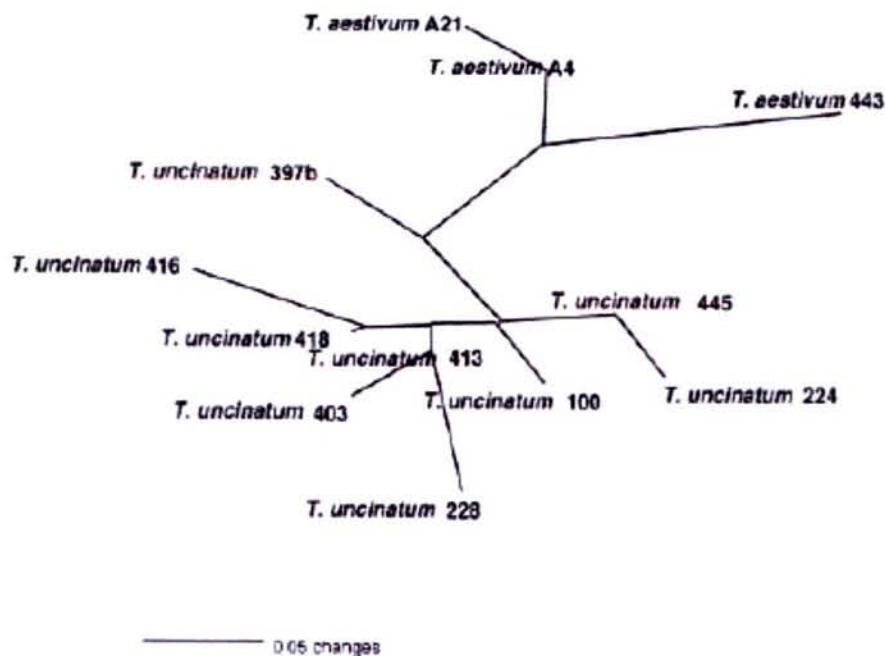


Figure 20. Arbre Neighbour-Joining obtenu avec les amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de *T. uncinatum* et *T. aestivum* (Mello et al., 2002).

Les techniques d'amplification aléatoire permettent d'identifier un certain nombre d'espèces morphologiques, mais l'existence d'importantes variations intraspécifiques pour certaines d'entre elles rendent ces méthodes inadéquates. De plus, leur utilisation afin de génotyper les tissus fongiques sur les apex ectomycorrhizés est impossible compte tenu de la présence de l'ADN de la plante. D'autres techniques de génotypage utilisant l'amplification PCR d'un locus bien défini du génome fongique se sont rapidement développées.

Analyse moléculaire par PCR dirigée

L'utilisation de la PCR dirigée a comme principal avantage d'être utilisable sur toutes les phases du cycle biologique des truffes (ascocarpes, mycélium et ectomycorhizes), nous verrons aussi qu'elle peut être utilisée sur des aliments pour éviter les fraudes. L'ADN ribosomique et, entre autre, l'*Internal transcribed spacer* (ITS) est la région la plus utilisée. Plusieurs raisons conduisent à choisir ce locus: (i) il existe toute une série d'amorces universelles pour l'amplifier (White et al., 1990 ; Gardes et Bruns, 1993) ; (ii) il s'agit de régions répétées dans le génome ce qui facilite son amplification (Cassidy et al., 1984) ; (iii) généralement, il existe un grand polymorphisme interspécifique, alors que le polymorphisme intraspécifique est beaucoup plus limité (Šelosse, 1998).

Le polymorphisme de l'ITS des *Tuber* a été mis en évidence par restriction enzymatique (RFLP) (Henrion et al., 1994 ; Amicucci et al., 1996 ; Paolocci et al., 1999 ; Roux et al., 1999), par hybridation avec une sonde (*southern blot*) (Paolocci et al., 1995), puis par séquençage direct (Roux et al., 1999 ; Mabru et al., 2001 ; Rubini et al., 2001 ; Mello et al., 2001 ; Mello et al., 2002 ; Paolocci et al., 2004).

A l'exception de *T. brumale*, qui a un ITS d'environ 1000 pb, toutes les autres espèces présentent une bande à 600-680 pb (Henrion et al., 1994 ; Roux et al., 1999). Henrion et al. (1994) ont pu différencier par RFLP de l'ITS avec *Alu1 / Hinf1* et *Rsa1 / Mbo1* plusieurs espèces : *T. borchii*, *T. brumale*, *T. excavatum*, *T. ferrugineum*, *T. magnatum*, *T. melanosporum* et *T. rufum*. Ces auteurs ont aussi utilisé l'*Intergenic spacer* (IGS) pour différencier les mêmes espèces. Ces résultats ont été confirmés par séquençage de l'ITS (Roux et al., 1999).

A l'exception de Mello et al. (2002), qui ont distingué *T. uncinatum* de *T. aestivum* par séquençage de l'ITS, les autres études basées sur ITS/RFLP et IGS / RFLP (Henrion et al., 1994), le séquençage de l'ITS, de la β -tubuline et du facteur d'élongation 1α (Paolocci et al., 2004) n'ont pas réussi à les distinguer.

En fait, la majorité des analyses se sont focalisées sur les espèces les plus intéressantes économiquement (*T. magnatum* et *T. melanosporum*). En effet, le développement des techniques de trufficulture nécessite des outils pour vérifier l'identité du champignon colonisant les apex racinaires des plants inoculés expérimentalement. Ces études ont conduit à la mise au point d'amorces spécifiques définies dans l'ITS ou bien correspondant à des régions amplifiées lors de la RAPD qui ont été clonées et séquencées (SCAR : *Sequence Characterized Amplified Random*) (Tableau 9).

Tableau 9. Amorces spécifiques de quelques espèces de *Tuber*, cette liste n'est pas exhaustive.

Espèce	Locus	Nom des amorces	Référence
<i>T. uncinatum-T. aestivum</i>	ITS	TuITS1-TuITS4	Luis, 2000
	ITS	Uncl-UnclI	Mello et al. (2002)
	SCAR	Tu1400f-Tu1400r	Luis, 2000
	SCAR	Tu1800f-Tu1800r	Luis, 2000
<i>T. melanosporum</i>	ITS	ITSML-ITS4LNB	Paolocci et al. (1999)
	ITS	MELF-MELR	Douet et al. (2004)
<i>T. brumale</i>	ITS	ITSB-ITS4LNB	Paolocci et al. (1999)
	ITS	SYLV1-SYLV2	Douet et al. (2004)
<i>T. indicum</i>	ITS	ITSCHCH-ITS4LNB	Paolocci et al. (1999)
	ITS	IndF1-IndR	Mabru et al. (2001)
	ITS	IndF2-IndR	Mabru et al. (2001)
<i>T. magnatum</i>	ITS	ITSMAGN-ITSBACK3	Rubini et al. (2001)
	ITS	TmagI-TmagII	Amicucci et al. (1998)
	ITS	P7-M3	Mello et al. (2001)
	SCAR	TAR I-TAR II	Amicucci et al. (1996)
<i>T. puberulum</i>	ITS	Tpul-Tpull	Amicucci et al. (1998)
<i>T. dryophilum</i>	ITS	TdryI-TdryII	Amicucci et al. (1998)
<i>T. maculatum</i>	ITS	TmacI-TmacII	Amicucci et al. (1998)
<i>T. borchii</i>	ITS	Tbol-Tboll	Amicucci et al. (1998)
	ITS	TBA-TBB	Mello et al. (2000)

Le développement de ces techniques de diagnostic moléculaire permet également de vérifier quelle espèce de truffe est utilisée dans les aliments en conserve. En effet, il existe dans cette filière agroalimentaire un risque de fraude, par exemple, *T. brumale* ou *T. indicum* sont employées à la place de *T. melanosporum*. Douet et al. (2004) ont testé des amorces PCR spécifiques définies dans l'ITS (Tableau 9) pour *T. melanosporum*, *T. brumale* et *T. indicum*. Après optimisation de l'extraction d'ADN et de la réaction PCR, ces auteurs ont réussi à amplifier ces trois espèces sur des ascocarpes qui avaient été stérilisés 1h30 à 115°C. Dans un travail similaire, Mabru et al. (2004) ont optimisé l'extraction de l'ADN ribosomique mitochondrial et dessiné les amorces (ADL1-ADL3) amplifiant neuf espèces de *Tuber*. Cette technique permet de détecter jusqu'à 5% de truffes contaminant une préparation cuisinée de *T. melanosporum*.

Existe-t-il encore des espèces de truffes qui soient difficiles à séparer ?

Nous pouvons conclure en disant que ces méthodes de PCR dirigée permettent d'identifier la majorité des espèces de truffes dans leurs différentes phases du cycle biologique. Il est même maintenant possible de détecter des contaminations par d'autres espèces dans les aliments. Toutefois, il persiste encore des doutes sur l'existence de certaines espèces morphologiques et principalement entre *T. uncinatum* et *T. aestivum*. (Encadré 10). Comme nous l'avons vu, Mouchès et al. (1978 et 1981), par l'analyse des protéines totales, et Mello et al. (2002), par une analyse avec des amorces microsatellites et le séquençage de l'ITS, sont parvenus à séparer ces deux taxa.

En revanche, l'analyse des isoenzymes (Pacioni et Pomponi, 1991 ; Pacioni et al., 1993 ; Dupré, 1997), de l'ITS/RFLP (Henrion et al., 1994) et du séquençage de l'ITS, de la β -tubuline et du facteur d'élongation 1- α (Rubini et al., 2004) ne sont pas parvenus à les distinguer.

Parmi les autres taxa posant problème (cf §1.1.3), *T. brumale* et *T. moschatum* sont séparés par les isoenzymes (Gandeboeuf et al., 1994), alors qu'ils ne le sont pas par RAPD (Gandeboeuf et al., 1997). En fait, ces deux taxa sont très proches et sont considérés comme deux variétés de la même espèce par Rioussset et al. (2001).

T. hiemalbum et *T. melanosporum*, ne sont pas différenciées par l'analyse moléculaire (Rioussset et al., 2001). Mais *T. hiemalbum* n'est pas un taxon très étudié car il est peu fréquent. Même si l'existence de ce taxon est très controversée, Rioussset et al. (2001) le considère comme valide de par ses caractéristiques morphologiques.

Encadré 10 *T. aestivum* Vittad. et *T. uncinatum* Chatin deux taxa très discutés (d'après Chevalier et al., 1994).

Les truffes du groupe *aestivum* sont l'objet d'une controverse dont l'origine remonte à 1887, année où le mycologue français Chatin a décidé de scinder l'espèce *T. aestivum*, définie plus tôt par Vittadini (1831), en deux taxons distincts : *T. aestivum* Vittad. et *T. uncinatum* Chat. Chatin différenciait les deux espèces par les critères suivants :

- Taille et morphologie des verrues du périidium (moins grosses et non striées transversalement chez *T. uncinatum*)
- Ornementation des spores (présence de papilles crochues chez *T. uncinatum*)
- Couleur de la gléba (plus foncée à maturité chez *T. uncinatum*)
- Odeur (plus forte et agréable à maturité chez *T. uncinatum*)
- Date de maturité (mai à juillet pour *T. aestivum* ; octobre à décembre pour *T. uncinatum*)

Les avis des auteurs postérieurs à Chatin sur le bien-fondé du nouveau taxon ont profondément divergé. Si Fischer (1897), Hollos (in Szemere, 1965), Knapp (1950-1951), Lange (1956) considèrent *T. uncinatum* soit comme une espèce à part entière, soit comme une variété de *T. aestivum*, Hawker (1954), Ceruti (1960) et Szemere (1965) assimilent tout simplement *T. aestivum* à *T. uncinatum*.

D'après Chevalier et al. (1978) les seules différences entre les deux taxons sont : la couleur de la gléba qui est généralement plus foncée à maturité dans le type *uncinatum* et le réseau qui orne les ascocarpes est plus développé (jusqu'à 8 μ m de hauteur) ; les alvéoles des spores sont également plus grandes, mieux fermées et plus régulières. Ils en concluent que le type *T. aestivum* (plus méridional) se caractérise par des ornements sporales hautes en moyenne de 2 μ m (« forme 2 μ m »), alors que l'autre type, *T. uncinatum* (plus septentrional), se caractérise par des ornements de 4 μ m (« forme 4 μ m »).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les outils d'identification des *Tuber*, les analyses moléculaires sont contradictoires, certains auteurs sont capables de séparer les deux taxa alors que d'autres ne le sont pas. Mais comment expliquer ces résultats divergents ? Il n'existe donc pas encore de réponse et le mystère *T. uncinatum* / *T. aestivum* reste entier...

1.4.3 Que sait-on sur la diversité intraspécifique et sur la structure génétique des *Tuber* ?

En fait, peu d'études se sont focalisées sur l'analyse de la diversité génétique intraspécifique et la différenciation génétique entre populations de truffes. Toutefois, les analyses de diversité génétique interspécifique, présentées dans le paragraphe précédent, permettent d'avoir une idée sur le niveau de diversité génétique intraspécifique des *Tuber*.

En effet, l'analyse RAPD de plusieurs espèces a permis de révéler deux groupes chez les *Tuber* (Gandebœuf et al., 1997). Le premier est composé d'espèces présentant un haut niveau de diversité génétique parmi lesquelles : *T. uncinatum*, *T. aestivum*, *T. mesentericum*, *T. excavatum*, *T. borchii* et *T. macrosporum* (Figure 21). En revanche, le second groupe comprend des espèces ayant un plus bas niveau de diversité génétique comme *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. brumale* et *T. moschatum* (Figure 21).

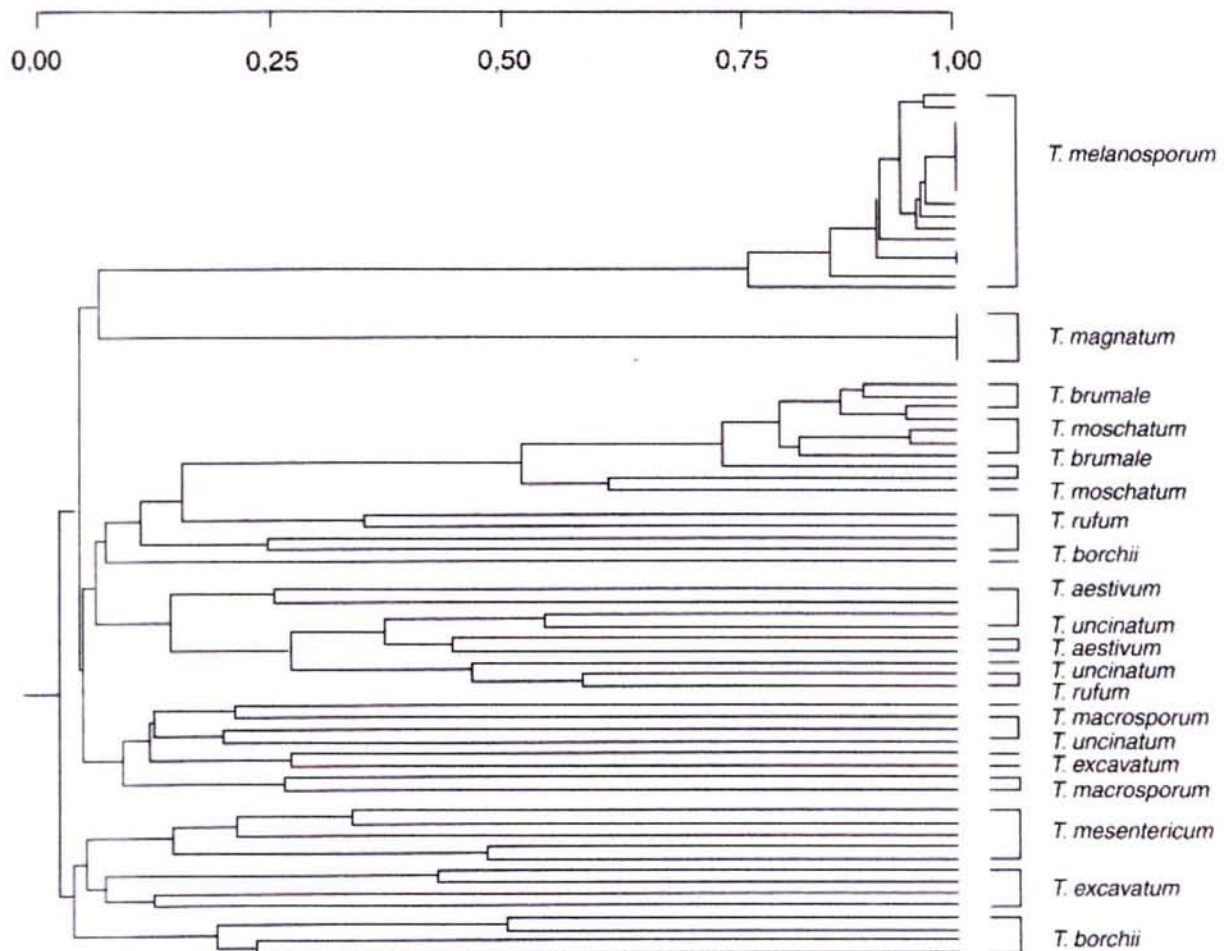


Figure 21. Dendrogramme UPGMA réalisé sur 11 taxons de *Tuber* à l'aide de la RAPD (indice de similarité de Jaccard) (Gandebœuf et al., 1997).

Le bas niveau de polymorphisme de *T. magnatum* et *T. melanosporum* a été confirmé par les isoenzymes (Cameleyre et Olivier, 1993 ; Frizzi et al., 2001), par RAPD (Lanfranco et al., 1993 ; Bertault et al., 1998 ; Murat, 2001) et par le séquençage de régions génomiques SCAR (Murat, 2001). Toutefois, si lors de mon DEA j'ai trouvé une faible diversité génétique pour la plupart des échantillons de *T. melanosporum* étudiés par RAPD, j'ai aussi identifié un polymorphisme plus élevé pour certains ascocarpes provenant principalement de Bourgogne (Figure 22 ; Murat, 2001). De même, Rubini et al. (2004) ont récemment publié 8 microsatellites polymorphes de *T. magnatum* dont un présente jusqu'à 18 allèles.

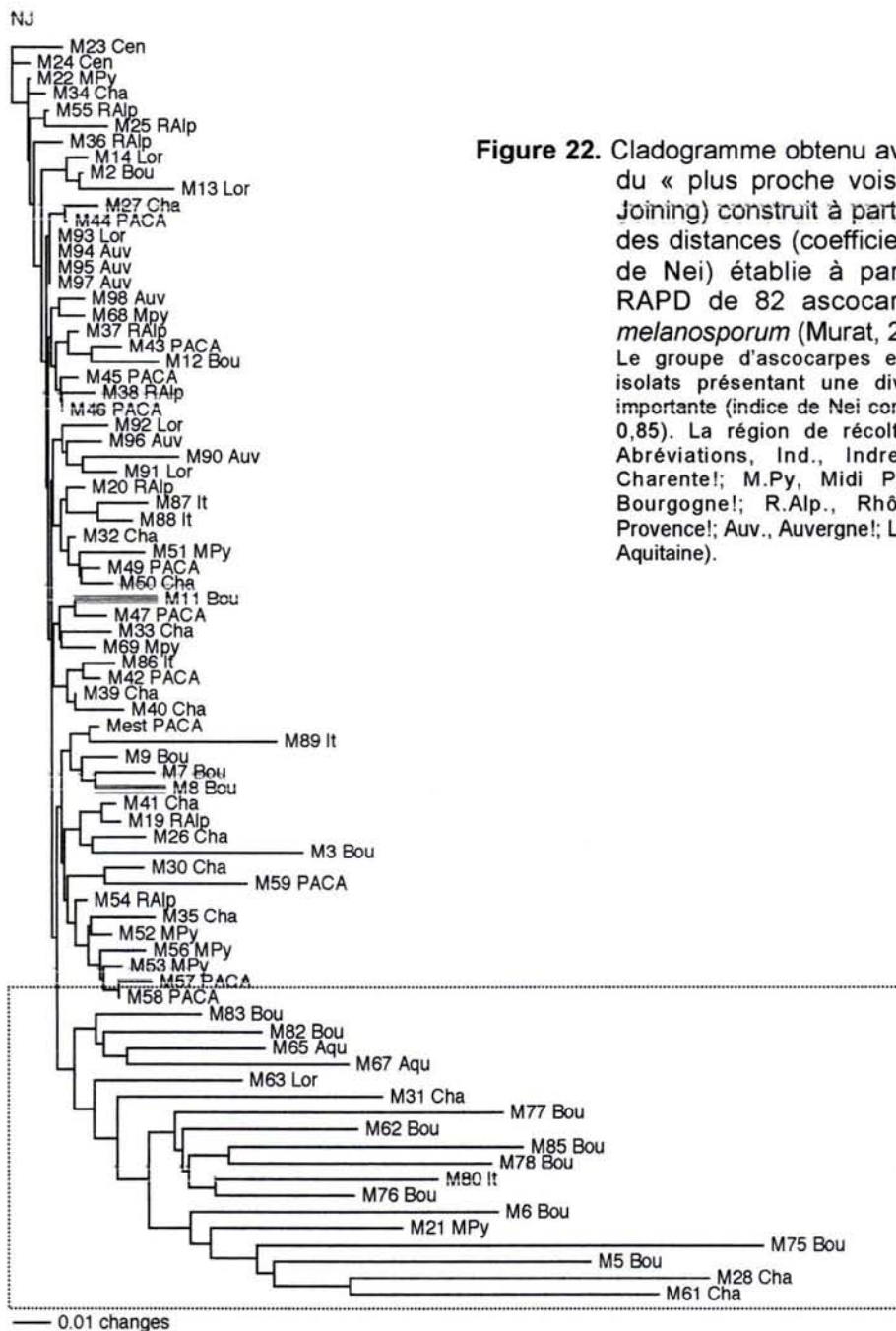


Figure 22. Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) construit à partir de la matrice des distances (coefficient de similarité de Nei) établie à partir des profils RAPD de 82 ascocarpes de *Tuber melanosporum* (Murat, 2001). Le groupe d'ascocarpes encadré inclut les isolats présentant une diversité génétique importante (indice de Nei compris entre 0,55 et 0,85). La région de récolte est indiquée (Abréviations, Ind., Indre-et-Loire; Cha., Charente!; M.Py, Midi Pyrénées ; Bou., Bourgogne!; R.Alp., Rhône-Alpes!; Pro., Provence!; Auv., Auvergne!; Lor., Lorraine! Aqu., Aquitaine).

Donc, même si le niveau de diversité génétique est plus faible pour ces deux espèces, il existe des régions génomiques qui présentent du polymorphisme et qui peuvent être utilisées pour des analyses de génétique des populations.

Existe-t-il une différenciation génétique entre les populations de truffes ?

Il n'existe que très peu de données sur la structure génétique des espèces de truffes. Longato et Bonfante (1997) rapportent une différenciation génétique pour *T. maculatum* puisqu'ils ont séparé avec l'amorce (GTG)₅ les échantillons provenant du Piémont de ceux de la Sardaigne. Mais leur objectif étant l'identification des espèces, ils n'ont pas poussé plus loin l'analyse de la différenciation génétique.

Frizzi et al. (2001) ont quant à eux étudié 13 populations italiennes de *T. magnatum* par les isoenzymes. Ces auteurs trouvent deux enzymes polymorphes : la malate deshydrogénase (*Mdh-2*) et l'enzyme malique (*Me-2*) pour un total de 6 types enzymatiques se distribuant dans les différentes populations. Les types A et B sont les plus fréquents, alors que le type D n'a été retrouvé que dans une population (Pianoro, Italie). Même s'il est difficile de tirer des conclusions sur la structure génétique de cette espèce, la distribution non homogène des types enzymatiques semble indiquer une différenciation génétique. Comme je l'ai déjà dit précédemment, Rubini et al. (2004) ont publié 8 microsatellites polymorphes qu'ils ont analysés sur 370 ascocarpes récoltés dans 28 populations. Malheureusement, ils n'ont pas encore publié les résultats de cette analyse et nous ne savons pas quelle est la distribution géographique de ces allèles dans les populations.

Donc, pour le moment nous ne savons presque rien sur la structure génétique de T. magnatum.

Les deux taxons *T. uncinatum* et *T. aestivum* n'ont pas été étudiés seulement du point de vue taxonomique. En effet, lors de son DEA, Patricia Luis a analysé la diversité génétique de ces truffes par RAPD et RAMS (Luis, 2000). Elle a mis en évidence une importante différenciation génétique entre communes ($F_{st} = 0,398$) et régions ($F_{st} = 0,112$). De même, Weden et al. (2004) ont aussi montré une différenciation génétique par RAPD du complexe *T. uncinatum* / *T. aestivum* récoltées sur l'île de Gotland en Suède. Malheureusement, ces études sont réalisées avec des marqueurs RAPD qui sont dominants, il faudrait donc reprendre ces analyses avec des marqueurs codominants. Mello et al. (2002) sont parvenus à séparer ces deux taxa par l'analyse moléculaire (RAMS et séquençage de l'ITS). Mais en regardant de plus près leurs résultats, il est

possible que cette distinction repose sur une différenciation génétique entre populations. Comme le montre la figure 23, le dendrogramme réalisé avec la RAMS sépare non seulement les *T. uncinatum* des *T. aestivum* mais aussi les échantillons de par leur origine géographique. Enfin, Paolocci et al. (2004) ont montré que l'ITS mais aussi la β -tubuline (4 allèles) et le facteur d'élongation 1- α (8 allèles) sont polymorphes pour ces taxa, il s'agit donc de bons marqueurs pouvant être utilisés pour des études de phylogéographie chez ces truffes.

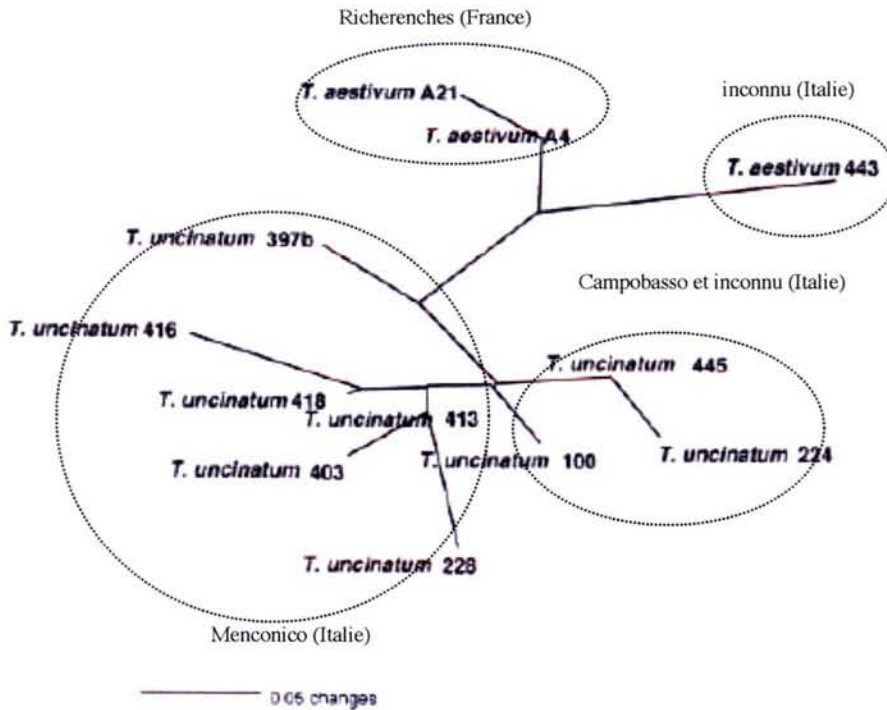


Figure 25. Cladogramme obtenu avec l'algorithme du « plus proche voisin » (Neighbor Joining) avec des amorces microsatellites sur 12 ascocarpes de *T. uncinatum* et *T. aestivum*, les origines géographiques des échantillons sont indiquées (Mello et al., 2002).

Les travaux de Luis (2000), Mello et al. (2002) et Weden et al. (2004) suggèrent une différenciation génétique relativement importante pour les taxa *T. uncinatum* et *T. aestivum*. Mais, pour le moment, il n'existe pas encore d'étude à grande échelle, sur toute l'aire de distribution (Tableau 4) de ces truffes, avec des marqueurs codominants.

T. melanosporum est l'espèce la plus étudiée du point de vue de la structure génétique. Bertault et al. (1998, 2001) ont analysé des échantillons provenant d'Italie, d'Espagne et du sud de la France par RAPD, RAMS et SSR (Tableau 8). Ces travaux confirment le bas niveau de

polymorphisme de cette truffe. D'autre part, le test de Mantel n'a pas révélé de corrélation entre la diversité génétique et la distance géographique. Ces auteurs concluent qu'il n'existe pas de différenciation génétique entre populations de *T. melanosporum*, suggérant que les différences organoleptiques entre truffes seraient liées au terroir et non à la génétique.

Le faible niveau de diversité génétique de T. melanosporum est expliqué par un effet « bottleneck » lors de la dernière glaciation, suivi d'une recolonisation rapide expliquant l'absence de structure génétique (Bertault et al., 1998).

Contrairement à Bertault et al. (1998), l'analyse que j'ai réalisée lors de mon DEA, sur un échantillonnage comprenant des populations du Nord-Est de la France (Bourgogne et Lorraine), a mis en évidence une importante différenciation génétique avec un équivalent du *Fst* calculé par l'indice de Shannon de 0,5 (Encadré 7) (Murat, 2001). Tout comme Bertault et al. (1998, 2001) je n'ai pas identifié de corrélation entre les distances génétiques et les distances géographiques, rejetant ainsi l'isolement par la distance pour expliquer la différenciation génétique observée. Mais il est possible que d'autres facteurs, comme la fragmentation ancestrale ou la recolonisation rapide (Figure 18), soient à l'origine de cette différenciation génétique. Sachant que les données RAPD sont sujettes à caution (Tableau 8), ces résultats doivent être confirmés avec d'autres marqueurs génétiques, comme la séquence de l'ITS ou l'analyse de microsatellites (SSR).

Comme nous venons de le voir, la structure génétique des différentes espèces de *Tuber* est en partie inconnue, seule celle de *T. melanosporum* a été réellement étudiée. Mais pour cette espèce les résultats sont encore contradictoires. En effet, ils dépendent de l'échantillonnage, des marqueurs moléculaires utilisés et des analyses statistiques effectuées. Donc, si après les travaux de Bertault et al. (1998) on pensait que deux truffes récoltées dans deux régions différentes étaient génétiquement identiques, les résultats de mon DEA relancent le débat (Murat, 2001).

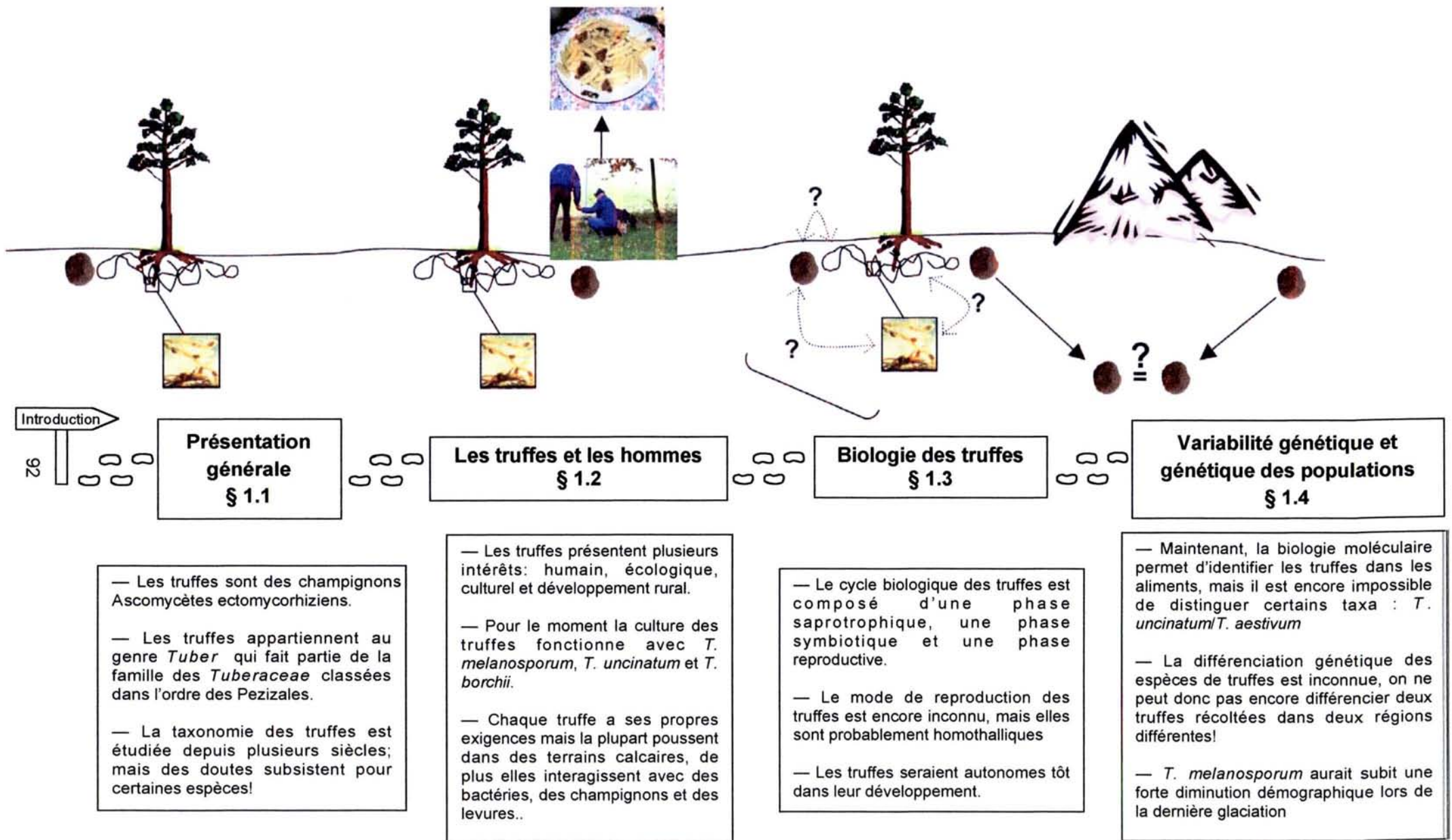


Figure 24. Schéma de conclusion de l'introduction générale dans lequel nous avons répondu aux questions que nous nous posions à la Figure 1.

Les objectifs de l'étude

Comme nous l'avons vu dans ce premier chapitre, la plupart des études portant sur les truffes concernent l'identification des espèces. Leur diversité génétique ainsi que leur structure génétique sont encore en grande partie inconnues. Ce travail de thèse a donc pour objectifs :

- 1- L'étude de la variabilité génétique et de la structure génétique de la truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum*) par le séquençage direct de l'ITS sur un échantillonnage provenant de toutes les régions productives françaises (échelle macro-géographique). Nous espérons ainsi avoir une idée de la différenciation génétique entre populations et de la phylogéographie de cette espèce.
- 2- L'étude de la diversité génétique de la truffe blanche du Piémont (*T. magnatum*) surtout à l'échelle micro-géographique dans une truffière naturelle. Lors de cette étude nous avons aussi quelques truffes récoltées dans d'autres régions. Ce travail pourrait donner une idée sur la dynamique et l'évolution d'une truffière naturelle.
- 3- Enfin, dans la même truffière de *T. magnatum*, nous avons récolté des apex racinaires afin d'avoir une idée sur la distribution spatiale et temporelle de cette truffe dans le sous-sol, mais aussi pour identifier les champignons ectomycorhiziens se trouvant dans cet écosystème truffier.

Références de l'introduction générale

- Agostini D., Polidori E., Palma F., Ceccaroli P., Saltarelli R., Tonelli D., Stocchi V., 2001. Cloning, expression, and characterization of the *hvk-1* gene from the white truffle *Tuber borchii* Vittad.; a first step toward understanding sugar metabolism. *Fungal Genetics and Biology*, 33(1), 15-23.
- Ambra R., Grimaldi B., Zamboni S., Filetici P., Macino G., Ballario P., 2004. Photomorphogenesis in the hypogeous fungus *Tuber borchii*: isolation and characterization of *Tbwc-1*, the homologue of the blue-light photoreceptor of *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 41 (7), 688-697
- Amicucci A., Rossi I., Potenza L., Zambonelli A., Agostini D., Palma F., Stocchi V., 1996. Identification of ectomycorrhizae from *Tuber* species by RFLP analysis of the ITS region. *Biotechnology Letters*, 18, 821-826
- Anderson I.C., Chambers S.M., Cairney J.W.G., 1998. Use of molecular methods to estimate the size and distribution of mycelial individuals of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Mycological Research*, 102, 295-30
- Avise J.C., 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7 (4), 371-379
- Balesarini, R., Mainieri D., Soragni E., Gairnerò L., Röllinò S., Viotti A., Ottonello S., Bonfante P., 2000. Differential expression of Chitin Synthase III and IV mRNAs in Ascomata of *Tuber borchii* Vittad. *Fungal Genetics and Biology*. 31, 219-232.
- Barbieri, E., J. Bertaux, P. Frey-Klett, J. Garbaye, A. Hartmann, M. Schmid, and V. Stocchi, 2002a. New evidence for *in situ* detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* bacterium associated to the ectomycorrhizal *Tuber borchii* Vittad. mycelium. 6th European Conference on Fungal Genetics. Pisa, Italy.
- Barbieri E., Riccioni G., Pisano A., Sisti D., Zeppa S., Agostini D., Stocchi V., 2002b. Competitive PCR for quantitation of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylum bacterium associated with the *Tuber borchii* Vittad. mycelium. *AEM* 68 (12): 6421-6424
- Barbieri E., Potenza L., Rossi I., Sisti D., Giomaro G., Rossetti S., Beimfohr C., Stocchi V. 2000. Phylogenetic characterization and *in situ* detection of *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Applied Environmental Microbiology*, 66 (11), 5035-5042.
- Barry D., Staunton S., Callot G., 1994. Mode of the absorption of water and nutrients by ascocarps of *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum*: a radioactive tracer technique. *Canadian Journal of Botany* 72 (3), 317-322
- Belloli S, Bologna F., Gregori G., Zambonelli A., 1999. Il tartufo di Fragno (*Tuber uncinatum* Ch.) : ecologia e coltivazione. Proceedings of the Fifth International Congress on truffle, Aix en Provence, France, 4-6 march 1999. Fédération nationale des trufficulteurs eds., Paris, 367-371
- Bergero R., Perotto S., Giralda M., Vidano G., Luppi A.M., 2000. Ericoid mycorrhizal fungi are common root associates of a Mediterranean ectomycorrhizal plant (*Quercus ilex*). *Molecular Ecology* 9, 1639-1649
- Bertault G., Raymond M., Berthomieu A., Callot G., Fernandez D., 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* 394, 734.
- Bertault G., Rousset F., Fernandez D., Berthomieu A. Hochberg, M. E., Callot G., Raymond M., 2001. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 88, 451-458.
- Bond U., Schlesinger M.J., 1985. Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 5, 949-956.
- Bonello P., Bruns T.D., Gardes M., 1998. Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist*, 138, 533-542
- Bonfante P., Balestrini R., Martino E., Perotto S., Plassard C., Mousain D., 1998. Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* strains. *Mycorrhiza*. 8, 1-10.
- Booth M.G., 2004. Mycorrhizal networks mediate overstorey-understorey competition in a temperate forest. *Ecology Letters* 7 (7), 538-546
- Botton B., Chalot M.; 1999. Nitrogen assimilation: enzymology in ectomycorrhizas. In *Mycorrhiza. Structure, function, molecular biology and biotechnology*. Varma, A., and Hock, B. (eds.) Heidelebrg: Springer-Verlag, 333-372
- Buscot F., Munch J.C., Charcosset J.Y., Gardes M., Nelhs U., Hamp R., 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. *FEMS Microbiol. Reviews* 24, 601-614
- Callot G. 1999. *La Truffe, la Terre, la Vie.* . INRA, Paris, 210 p.
- Cameleyre I., Olivier J.M., 1993. Evidence for intraspecific isoenzyme variations among French isolates of *Tuber melanosporum* (Vitt.). *FEMS Microbiology Letters*, 110 : 159-162
- Carbone I., Kohn L.M., 2001. Multilocus nested haplotype networks extended with DNA fingerprints show common origin and fine-scale, ongoing genetic divergence in a wild microbial metapopulation. *Molecular Ecology*, 10 (10), 2409-2422
- Cassidy J.R., Moore D., Lu B.C., Pukkila P.J., 1984. Unusual organization and lack of recombination in the ribosomal RNA genes of *Coprinus cinereus*. *Current Genetics*, 8, 607-613
- Ceccaroli P., Saltarelli R., Buffalini M., Piccoli G. and Stocchi V., 1999. Three different forms of hexokinase are identified during *Tuber Borchii* mycelium growth. *Mol. Cell. Biol.* 194 (1-2): 71-77.
- Ceccaroli P., Saltarelli R., Cesari P., Pierleoni R., Sacconi C., Vallorani L., Rubini P., Stocchi V., Martin F., 2003. Carbohydrate and amino acid metabolism in *Tuber borchii* mycelium during glucose utilization: a C-13 NMR study. *Fungal Genetics and Biology*, 39 (2), 168-175
- Ceccaroli P., Saltarelli R., Cesari P., Zambonelli A. and Stocchi V. 2001. Effects of different carbohydrate sources on the growth of *Tuber borchii* Vittad. mycelium strains in pure culture. In *Molecular and Cellular Biochemistry*. 218(1-2):65-70.
- Ceruti A., 1960. Elaphomycetales e Tuberales. In : J. Bresadola, *Iconographia Micologica*, 28, suppl. 2, Tridenti, Trento, 100 p.
- Ceruti, A., Fontana, A., Nosenzo C., 2003. Le Specie Europee del Genere *Tuber*. Museo Regionale., 560 p.
- Cesalpino A., 1583 *De plantis libri XVI*, Florence.
- Chatin A.D., 1869. *La truffe*. Ed. Bouchard-Huzard, Paris, 202 p.
- Chatin A.D., 1887. Une nouvelle espèce de truffe : *Tuber uncinatum*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 104, 1132.
- Chevalier G ;, 1973. Synthèse axénique des mycorhizes de tuber brumale Vitt. à partir de cultures pures du champignon. *Annals of Phytopathology*, 5 (2), 163-182.
- Chevalier G. & Grente J., 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne : production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe. *Mushr. Sci.* 10 (2), 483-505.
- Chevalier G., Frochot H. 1989. Ecology and possibility of culture in Europe of the Burgundy truffle (*Tuber uncinatum* Ch.). *Agric. Ecosystems Environ.*, 28, 1/4, p. 71-73.
- Chevalier G., Frochot H. 1990. Ecologie et possibilités de culture en Europe de la truffe de Bourgogne (*Tuber uncinatum* Ch.). *C. R. 2° Congr. Int. Sur la truffe*, Spoleto, Italie, 24-27 nov. 1988, p. 323-330.
- Chevalier G., Frochot H., 1997. *La truffe de Bourgogne*, Ed. Pétrarque, 257p
- Chevalier G., Gandeboeuf D., Masclaux F., Dupré C. 2000. Application des méthodes biochimiques et moléculaires à la taxonomie et la systématique des *Tuber*. *Bull. Famm. N. S.*,

- 18, 57-
- Chevalier G., Rioussel L. & G., Dupré C., Gandeboeuf D. 1994. *Tuber uncinatum* Chat. et *T. aestivum* Vitt., espèces différentes ou simples variétés de la même espèce ? Doc. Mycol., 24 (95), 17-20
- Chevalier, G., G. Rioussel & C. Dupré, 1985. Taxonomie des truffes européennes. In Les Mycorrhizes. Proceedings of the 1st European Symposium on Mycorrhizae (édité par V. Gianinazzi-Person & S. Gianinazzi). INRA, Paris, p. 631-653
- Chevalier, G.; Gregori, G.; Frochot, H.; Zambonelli, A., 2002. The cultivation of the Burgundy truffle. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Citterio B., Malatesta M., Battistelli S., Marcheggiani F., Bajone W., Saltarelli R., Stocchi V., 2001. Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and Bacillaceae in structural modification of *Tuber borchii* fruit bodies. Canadian Journal of Microbiology, 47, 264-268.
- Citterio B., P. Cardoni, L. Potenza, A. Amicucci, V. Stocchi, G. Gola & M. Nuti, 1995. Isolation of bacteria from sporocarps of *Tuber magnatum* Pico, *Tuber Borchii* Vitt. And *Tuber maculatum* Vit. In Biotechnology of Ectomycorrhizae (Edited by Vilberto Stocchi et al.) Plenum Press, New York.
- Courvoisier M., 1992. Bilan de la filière truffe en France, bio markets research. Ed. Ctif, Bio Markets, Paris.
- Dahlberg A., 1997. Population ecology of *Suillus variegatus* in old Swedish Scots pine forests. Mycological Research, 101, 47-54
- Dahlberg A., 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. New Phytologist, 150, 555-562
- Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J.E., 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. Canadian Journal of Botany, 75, 1323-1335
- Dahlberg A., Stenlid J., 1994. Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L.: Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility. New Phytol., 128, 225-234
- Dahlberg A., Stenlid J., 1995. Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. Canadian Journal of Botany, 73, S1222-S1230
- De Bellis R., Agostini D., Piccoli G., Vallorani L., Potenza L., Sisti D., Amoresano A., Pucci P., Arpaia G., Macino G., Balestrini R., Bonfante P., Stocchi V., 1998. The *tbf-1* gene from the white truffle *Tuber borchii* codes for a structural cell wall protein specifically expressed in fruitbody. Fungal Genetics and Biology 25 (2), 87-99
- De Miguel A., De Roman M., Etayo M.L., 2002. Mycorrhizal fungi competing with *Tuber melanosporum* Vitt. In cultivated truffle beds in north-eastern Spain. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- De Vries G. A., 1971. De fungi van Nederland 3 : Hypogaea, Wetenschap. Meded. Konink. Nedwerlandske Natuurhist. Verenig., 88, p. 1-64
- De Vries G. A., 1977. Contribution à la connaissance des champignons hypogés de la Belgique. Lejeunia, 86, n.s.
- Dennis R.W.G. 1981. British Ascomycetes. J. Cramer, Vaduz. Developmental Biology. 1:177-184.
- Dickie I.A., Xu B., Koide R.T., 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New phyt. 156, 527-537
- Diez J., Anta B., Manjon J.L., Honrubia M., 2001. Genetic variability of *Pisolithus* isolates associated with native hosts and exotic *eucalyptus* in the western Mediterranean region. New Phytologist, 149, 577-587
- Donadini J.C., Rioussel L.J., Chevalier G., 1978. *Tuber malençonii*. Bull. Soc. Mycol. Fr., 94, 351-358.
- Douet J. P., Castroviejo M., Mabru D., Chevalier G., Dupre C., Bergougnot F., Ricard J. M., Medina B., 2004. Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. Analytical and Bioanalytical Chemistry 379 (4), 668-673
- Dupré C., 1997. De nouveaux outils au service de la trufficulture. ENESAD, mémoire en vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur délivré par l'état. 84 p.
- Dupré C., Chevalier G., Branlard G., 1985. Caractérisation des mycorrhizes de différents *Tuber* par l'étude du polymorphisme enzymatique. C.R. 1^{er} Coll. Natl. Sur les techniques de purification des protéines, Paris, 1-3 octobre 1984, DIPC-INPL public, 465-467
- Emerson B.C., Paradis E., Thébaud C., 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. Trends in Ecology and Evolution, 16 (12), 707-716
- Ewase J.O., Moore D., Stewart G.R., 1978. Coordinate regulation of enzymes involved in ornithine metabolism and its relation to sporophore morphogenesis in *Coprinus cinereus*. J. Gen. Microbiol. 107, 343-357.
- Fassi B., De Vecchi E., 1962. Ricerche sulle micorrize ectotrofiche del Pino strobo in vivaio. I. Descrizione di alcune forme più diffuse in Piemonte. Allionia, 8, 133-152
- Fassi B., Fontana A., 1969. Sintesi micorrizica tra *Pinus strobus* e *Tuber maculatum*. II. Sviluppo dei semenzali trapianti e produzione di ascocarpi. Allionia, 15, 115-120
- 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
- Fischer E., 1897. Tuberales und Hemiasceen. In : Die Pilze Deutschlands, Österreich und der Schweiz. V. Ascomyceten. L. Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Bd 1, Abt. 5 : Ascomyceten, 2^e éd., Reprint J. Cramer, Weinheim, Leipzig, 37-61
- Frank, B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Berlin, v. 3, 128-145.
- Frankland J.C., 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. Mycological Research, 102, 1-15
- Frey P., Frey-Klett P., Garbaye J., Berge O., Heulin T., 1997. Metabolic and genotypic fingerprinting of fluorescent pseudomonads associated with the Douglas fir-Laccaria bicolor mycorrhizosphere. Applied and Environmental Microbiology, 63, 1852-1860
- Fries N., Serck-Hanssen K., Häll Dimberg L., Theander O., 1987. Abietic acid an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). Exp Mycol 11: 360-363
- Frizzi G., Lalli G., Miranda M., Pacioni G., 2001. Intraspecific isoenzyme variability in Italian population of the white truffle *Tuber magnatum*. Mycological Research, 105 (3), 365-369.
- Gandeboeuf D., 1997. Caractérisation et identification moléculaire de différentes espèces de genre *Tuber*. Thèse de doctorat de l'université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. France. 65 p.
- Gandeboeuf D., Dupré C., Chevalier G., 1994. Différenciation des truffes européennes d'intérêt commercial par analyse des isoenzymes. Acta botanica Gallica, 141 (4), 455-463
- Gandeboeuf D., Dupré C., Roeckel-Drevet P., Nicolas P., Chevalier G., 1997. Typing *Tuber* ectomycorrhizae by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers. Canadian Journal of Microbiology 43, 723-728
- Garbaye J., 1991. Utilisation des mycorrhizes en sylviculture. In : Strullu D.G. ed Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Lavoisier, Paris, 197-248.
- Gardes M., Bruns T.D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol., 2, 113-118
- Garnero L., Lazzari B., Manieri D., Viotti A., Bonfante P., 2000. TMchs4, a class IV chitin synthase gene from the ectomycorrhizal *Tuber magnatum*. Mycological Research 104 (6), 703-707.
- Gherbi H., Delaruelle C., Selosse M.A., Martin F., 1999. High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beach forest. Molecular Ecology, 8, 2003-2013
- Gianinazzi-Pearson V., Brechenmacher L., Tamasloukht M. Bécard G., La Camera S., Gianinazzi S., Franken P., 2002.

- Functional genomics of fungal-plant communication in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Int. Mycol. Congr.* 7, 11-17.
- Giomas G., Sisti D., Zambonelli A., Amicucci A., Cecchini M., Comandini O., Stocchi V., 2002. Comparative study and molecular characterization of ectomycorrhizas in *Tilia americana* and *Quercus pubescens* with *Tuber brumale*. *FEMS Microbiol. Lett.* 216 (1): 9-14.
- Glass N.L. and Staben C. 1990. Genetic control of Mating in *Neurospora crassa*. *Seminars in Developmental Biology*, 1, 177-184
- Glass N.L., Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61 (4), 1323-1330.
- Glass N.L., Kuldau G.A. 1992. Matin Type and negative incompatibility in filamentous Ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*. 30:201-224.
- Gregori L., 2002. Problems and expectations with the cultivation of *Tuber magnatum*. *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Grime J. P., Mackey J. M. L., Hillier S. H., Read D. J., 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature*, 328, 420-422.
- Gross G., 1987. Schlüssel zu den europäischen Sippen der Gattung *Tuber*. In : *Atlas der Pilze des Saarlandes*. Eds. H.E. Derbsch und J.A. Schmitt, Teil 2, Delattinia, Saarbrücken, 79-100.
- Gryta H., Debaud J.C., Effosse A., Gay G., Marmeisse R., 1997. Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* in coastal sand dune forest ecosystems. *Molecular Ecology* 6, 353-364
- Guelh J.M., Garbaye J., Wartinger A., 1992. The effects of ectomycorrhizal status on plant-water relations and sensitivity of leaf gas exchange to soil drought in Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) seedlings. In *Mycorrhizas ecosystems* (édité par D.J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter et I.J. Alexander). CAB International, Wallingford, p. 323-332
- Guescini M., Pierleoni R., Palma F., Zeppa S., Vallorani L., Potenza E., Sacconi G., Giomas G., Stocchi V., 2003. Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. *Molecular Genetic and Genomics*, 269, 807-816.
- Guidi C., Zeppa S., Barbieri E., Zambonelli A., Polidori E., Potenza L. and Stocchi V. 2003. A putative mitochondrial fission gene from the ectomycorrhizal ascomycete *Tuber borchii* Vittad.: cloning, characterization and phylogeny. *Current Genetics* 44(3), 148-154.
- Guidot A., Debaud J.C., Effosse A., Marmeisse R., 2004. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 161, 539-547
- Guidot A., Debaud J.C., Marmeisse R., 2001. Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *Molecular Ecology*, 10, 1121-1131
- Guidot A., Debaud J.C., 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, 477-486
- Gutiérrez A., Morte A., Honrubia M., 2003. Morphological characterization of the mycorrhiza formed by *Helianthemum almeriense* Pau with *Terfezia clavaryi* Chatin and *Picota lefebvrei* (Pat.) Maire. *Mycorrhiza*. 14(1), 26-37.
- Hall I.R., Yun W., Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol.* 21 (10): 433-438
- Hare M.P., 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*. 16 (12), 700-706
- Hartl D. 1994. *Génétique des populations*. Ed. Flammarion, 305 p.
- Hawker L.E., 1954. *Britisch Hypogeous fungi*. *Phil. Trans. Roy. Soc. London, ser. B., Biol. Sci.*, 237, 429-546.
- He Q.Y., Cheng P., Yang Y.H., Wang L.X., Gardner K.H., Liu Y., 2002. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297 (5582), 840-843
- Helgason T., Daniell T.J., Husband R., Fitter A.H., Young J.P.W., 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394, 431
- Henrion B., G. Chevalier & F. Martin, 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycologia* 98, 37-43
- Hey J., Machado C.A., 2003. The study of structured populations - new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4 : 535-543
- Hoekstra R.F., 1996. Horizontal transmission in fungal populations. In *Fungal genetics, principle and Practices*. Edited by Cees J. Bos
- Horton T.R., Bruns T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10, 1855-1871
- Iotti M., Amicucci A., Stocchi V. and Zambonelli A. 2002. Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytologist* 155, 499-505
- Jang J.C., Sheen J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science*, 2: 208-214
- Jány J.L., Garbaye J., Martin F., 2002. Cenococccum geophilium populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytologist*, 154, 651-659
- Javelle A., Morel M., Rodriguez-Pastrana B.R., Botton B., André B., Marini A.M., Brun A., Chalot, M., 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *Molecular Microbiology* 47, 411-430
- Javelle A., Rodriguez-Pastrana B.R., Jacob C., Botton B., Brun A., André B., Marini A.M., Chalot, M., 2001. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium*. *FEBS Letters* 505, 393-398
- Jerome C.A., Ford B.A., 2002. Comparative population structure and genetic diversity of *Arceuthobium americanum* (Viscaceae) and its *Pinus* host species: insight into host-parasite evolution in parasitic angiosperms. *Molecular Ecology* 11 (3), 407-420
- Johannesson H. 2000. Ecology of *Daldinia* spp. With special emphasis on *Daldinia loculata*. Doctoral thesis, University of Uppsala, 43 p.
- Jonsson L., Dahlberg A., Nilsson M.C., Zackrisson O., Karen O., 1999. Ectomycorrhizal fungal communities in late-successional Swedish boreal forests, and their composition following wildfire. *Molecular Ecology* 8, 205-215
- Kagan-Zur V., Freeman S., Luzzati Y., Roth-Bejerano N., Shabi E. 2001. Survival of introduced *Tuber melanosporum* at two sites in Israel as measured by occurrence of mycorrhizas. *Plant and Soil* 229, 159-166
- Kennedy P.G., Izzo A.D., Bruns T.D., 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 (6), 1071-1080
- Knapp A., 1950. Die europäischen Hypogaeen-Gattungen und ihre Gattungstypen. *Schweiz. Zeitschr. f. Pilzkd.*, 28 (10), 175-179
- Knapp A., 1951. Die europäischen Hypogaeen-Gattungen und ihre Gattungstypen. *Schweiz. Zeitschr. f. Pilzkd.*, 29 (4), 84-87
- Knowles L.L., Maddison W.P., 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.
- Koide R.T., 2000. Functional complementary in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 147, 233-235
- Koide R.T., Dickie I.A., 2002. Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant and Soil*, 244 (1-2): 307-317
- Lacourt I., Duplessis S., Abba S., Bonfante P. and Martin F. 2002. Isolation and characterization of differentially expressed genes in the mycelium and fruit body of *Tuber borchii*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9), 4574-82.
- Landeweert R., Leeflang P., Kuyper T.W., Hoffland E., Rosling A., Wernars K., Smit E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 327-333
- Lanfranco L., Arlorio M., Matteucci A., Bonfante P. 1995. Truffles:

- their life cycle and molecular characterization. In *Biotechnology of ectomycorrhizae. Molecular approaches* (Stocchi V., Bonfante P., Nuti M.). Plenum Press. New York and London.
- Lanfranco L., Wyss P., Marzachi C., Bonfante P. 1993. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. *FEMS Microbiology Letters*, 114, 245-25
- Lange M., 1956. Danish hypogeous macromycetes. *Dansk. Bot. Arkiv*, 16, 1-84.
- Largent D.L., Sugihara N., Brinitzer A., 1980a. *Amanita gemmata*, a non-host specific mycorrhizal fungus of *Arctostaphylos manzanita*. *Mycologia* 72, 435-439
- Largent D.L., Sugihara N., Wishner G., 1980b. Occurrence of mycorrhizae on ericaceous and pyrolaceous plants in northern California. *Canadian Journal of Botany* 58, 2274-2279
- Le Tacon F., J. Garbaye, D. Bouchard, G. Chevalier, J. M. Olivier, J. Guimberteau, N. Poitou & H. frochot, 1988. Field result from ectomycorrhizal inoculation in France. In *Canadian workshop on Mycorrhizal in Forestry* (edited by Lalonde, Pichey) : 51-74
- Le Tacon F., Selosse M.A. 1994. La place des symbioses mycorrhiziennes dans l'évolution et la colonisation des continents pour la vie. *Acta botanica Gallica*, 141, 405-419
- LePage B.A., Currah R.S., Stockey R.A., Rothwell G.W. 1997. Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene. *American Journal of Botany*, 84, 410-412
- Lewis D.H., 1986. Inter-relations between carbon nutrition and morphogenesis in mycorrhizas. In *Mycorrhizas : their physiology and genetics. Proceeding of the First European Symposium on Mycorrhizas* (ed. V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi, INRA, Paris, 85-100.
- Leyval C., Turnau K., Haselwandter K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7 (3), 139-153
- Longato S., Bonfante P., 1997. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycological Research*, 101, 425-43
- Lowe A.J., Gillies A.C.M., Wilson J., Dawson I.K., 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology* 9 (7), 831-841
- Luis P., 2000. Caractérisation de la diversité génétique des populations chez *Tuber uncinatum* et *Tuber melanosporum*. DEA de l'université Claude Bernard, Lyon I-France. 47 p.
- Luis P., Walther G., Kellner H., Martin F., Buscot F., 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 1025-1036
- Luppi-Mosca A.M., 1973. La microflora della rizosfera nelle tartufae. *Allionia*, 19, 29-32
- Mabru D., Douet J.P., Mouton A., Dupre C., Ricard J.M., Medina B., Castroviejo M., Chevalier G., 2004. PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and other truffle species in cans. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (1), 33-42
- Mabru D., Dupré C., Douet J. P., Leroy P., Ravel C., Ricard J. M., Medina B., Castroviejo M., Chevalier G., 2001. Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products : fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11 : 89-94
- Malloch D.W., Pirozynski K.A., Raven P.H., 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (a review) *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77, 2113-2118
- Mamoun M. & J. M. Olivier, 1991. Influence du substrat carboné et de la forme d'azote minéral sur la croissance de *Tuber melanosporum* Vitt. en culture pure. Application à la production de biomasse mycélienne. *Agronomie*, 11, 521-527
- Mamoun M. & J. M. Olivier, 1993. Competition between *Tuber melanosporum* and other ectomycorrhizal fungi under two irrigation regimes. *Plant and Soil* 149 : 211-218
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression. *Cancer Research*, 27, 209-220
- Martin F., Duplessis S., Ditengou F., Lagrange H., Voiblet C., Lapeyrie F., 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151, 145-154
- Martin F., Tagu D., 1999. Developmental biology of a plant-fungus symbiosis : the ectomycorrhiza. In *Mycorrhiza* (eds Varma A. and Hock B.), second edition, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York
- Melin E., Nilsson H., 1950. Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiologia Plantarum* 3, 88-92
- Mello A., Cantisani A., Vizzini A., Bonfante, P., 2002. Genetic variation of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environmental Microbiology*, 4 (10), 584-594
- Mello, A., Fontana, A., Meotto, F., Comandini, O., Bonfante P., 2001. Molecular and morphological characterization of *T. magnatum* mycorrhizas in a long-term survey. *Microbiol Res* 155: 279-284
- Menotta M., Amicucci A., Sisti D., Gioacchini A.M., Stocchi V., 2004a. Differential gene expression during pre-symbiotic interaction between *Tuber borchii* Vittad. and *Tilia americana* L. *Current Genetics*. 46 (3), 158-165
- Menotta M., Gioacchini A.M., Amicucci A., Buffalini M., Sisti D., Stocchi V., 2004b. Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry in the investigation of volatile organic compounds in an ectomycorrhizae synthesis system. *Rapid Communications in Mass spectrometry* 18 (2), 206-210.
- Miozzi (2003) La transizione dalla fase vegetativa a quella simbiotica in *Tuber borchii* Vittad.: un'analisi cellulare e molecolare. PhD thesis, università di Torino (Italy), 190 p.
- Molina R.H., Massicotte H., Trappe J., 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses : community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal functioning- an integrated plant-fungal process* (édité par M.F. Allen). Chapman and Hall, New York, 357-417
- Montanini B., 2003. Risposte molecolari alla deprivazione di azoto in un fungo filamentoso simbiotico. PhD thesis, Università di Parma, 159 p.
- Montanini B., Betti M., Marquez A.J., Balestrini R., Bonfante P., Ottonello, S., 2003. Distinctive properties and expression profiles of glutamine synthetase from a plant symbiotic fungus. *Biochemical Journal*, 373, 357-368.
- Montanini B., Moretto N., Soragni E., Percudani R., Ottonello, S., 2002. A high-affinity ammonium transporter from the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. *Fungal and Genetic Biology*, 36, 22-34.
- Montecchi A., Lazzari G. 1987. Un nuovo tartufo di montagna : *Tuber regianum* sp. Nov. *Riv. Micol.* 30 (1-2), 3-11.
- Montecchi A., Lazzari G. 1993. Atlante fotografico di Funghi Ipogei. Ed. Associazione Micologica Bresadola, Centro Studi Micologici, Trento, 490 p.
- Moore D., 1998. *Fungal morphogenesis*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Mouches C., Duthil P., Bove J.M., Valjalo J, Delmas J., 1978. Caractérisation des champignons supérieurs par électrophorèse de leurs protéines. *Mushr. Sci.*, 10 (1), 491-503
- Mouches C., Duthil P., Poitou N, Delmas J., Bove J.M., 1981. Caractérisation des espèces truffières par analyse de leurs protéines en gels de polyacrylamide et application de ces techniques à la taxonomie des champignons. *Mushr. Sci.*, 11, 819-831
- Murat C., 2001. Etude de la diversité génétique de la Truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). Diplôme d'Etude Approfondie, Université de Nancy
- Nelson M.A., 1996. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends in Genetics* ,12, 69-74
- O'Donnell K., Cigelnik E., Weber N.S. and Trappe J.M. 1997. Phylogenetic relationships among ascomycetous truffles and the true and false morels inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequence analysis. *Mycologia*, 89 (1): 48-65
- Pacioni G. 1988. Impatto di nuove metodologie sulla tassonomia. C. R. 2° Congr. Int. Sur la truffe, Spoleto, Italie, 24-27 novembre 1988, 51-52
- Pacioni G., Fantini P. 1997. *Tuber bellonae* un tartufo mediterraneo del complesso *Tuber aestivum-Tuber mesentericum*. *Micol. E Veg. Mediterr.*, 12 (1), 15-20.
- Pacioni G., Frizzi G., Miranda M., Visca C., 1993. Genetics of a

- Tuber aestivum* population (Ascomycotina, Tuberales). Mycotaxon, XL, 93-100
- Pacioni G., Pomponi G. 1989. Chemotaxonomy of some Italian species of *Tuber*. Micol. E Veg. Mediterr., 4 (1), 63-72.
- Pacioni G., Pomponi G. 1991. Genotypic patterns of some Italian species of *Tuber aestivum*-*Tuber mesentericum* complex. Mycotaxon, 42, 171-179.
- Palenzona M., 1969. Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Coryllus avelana*. Allionia, 15, 121-131
- Palenzona M., Chevalier G., Fontana A. 1972. Sintesi micorrizica tra i miceli in coltura di *Tuber brumale*, *T. melanosporum*, *T. rufum* e semenzali di conifere e latifoglie. Allionia, 18, 41-52
- Paolocci F., Angelini P., Cristofari E., Granetti B., Arcioni S., 1995. Identification of *Tuber* spp and corresponding ectomycorrhizae through molecular markers. J. Sci. Food Agric., 69, 511-517
- Paolocci F., Rubini A., Granetti B., Arcioni S., 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. Ectomycorrhizae. FEMS Microbiology Ecology 28 : 23-30.
- Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Topini F., Arcioni S., 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? FEMS Microbiology Letters 235 (1), 109-115
- Pegler D.N., Spooner B.M., Young T.W.K. 1993. *British Truffles : a revision of British Hypogeous Fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew, 216 p.
- Percudani R., Trevisi A., Zambonelli A. and Ottonello S. 1999. Molecular Phylogeny of Truffles (Pezizales: Terfeziaceae, Tuberales) Derived from Nuclear rDNA Sequence Analysis. Molecular Phylogenetic Evolution, 13 (1), 169-180.
- Piazza A., 2003. Genetica di popolazione. In: Dizionario di Biologia. A Fasolo Ed. UTET Torino
- Pierleoni R., Buffalini M., Vallorani L., Guidi C., Zeppa S., Sacconi C., Pucci P., Amoresano A., Casbarra A., Stocchi V., 2004. *Tuber borchii* fruit body: 2-dimensional profile and protein identification. Phytochemistry, 65 (7), 813-820
- Pierleoni R., Vallorani L., Sacconi C., Sisti D., Giomaro G., Stocchi V., 2001. Evaluation of the enzymes involved in primary nitrogen metabolism in *Tilia platyphyllos* *Tuber borchii* ectomycorrhizae. In Plant Physiol. Biochem. 39 (12), 1111-1114
- Pöggeler S., 2001. Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. Applied Microbiology Biotechnology, 56, 589-601
- Polidori E., Agostini D., Zeppa S., Potenza L., Palma F., Sisti D., Stocchi V., 2002. Identification of differentially expressed cDNA clones in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae using a differential screening approach. Mol. Genet. Genomics. 266, 858-864.
- Polidori E., Saltarelli R., Ceccaroli P., Buffalini M., Pierleoni R., Palma F., Bonfante P., Stocchi V., 2004. Enolase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad.: biochemical characterization, molecular cloning, and localization. Fungal Genetics and Biology 41 (2), 157-167
- Poma A., Venora G., Miranda M., Pacioni G. The karyotypes of three *Tuber* species (Pezizales, Ascomycota). Caryologia 55 (4), 307-313
- Pons O., Petit R.J., 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. Genetics, 144, 1237-1245.
- Posada D., Crandall K.A., 2001. Intraspecific gene genealogies : trees grafting into networks. Trends in Ecology and Evolution, 16, 37-45
- Potenza L., Amicucci A., Rossi I., Palma F., De Bellis R., Cardoni P., Stocchi V., 1994. Identification of *Tuber magnatum* pico DNA markers by RAPD analysis. In "Biotechnology Techniques", Vol. 8, 93-98
- Prospero S., Rigling D., Holdenrieder O., 2003. Population structure of *Armillaria* species in managed Norway spruce stands in the Alps. New Phytologist, 137, 357-369
- Rabouan C., Comes A. M., Bretagnolle V., Humbert J.-F., Periquet G., Bigot Y., 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. Molecular Ecology 8, 493-503.
- Read D., 1997. Mycorrhizal fungi. The ties that bind. Nature 388, 517-51
- Redecker D., Szaro T.M., Bowman R.J., Bruns T.D., 2001. Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremoricolor* and *Amanita francheti* in late-stage ectomycorrhizal successions. Molecular Ecology, 10, 1025-1034
- Reyna, S.; Rodriguez Barreal, J. A.; Folch, L.; Perez-Badia, R., Garcia S.; Jimenez E.; 2002. Truffle silviculture in Mediterranean forests. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Ridley M., 1996. Evolution (seconde édition). Blackwell Science, Cambridge, Massachusetts (USA), 719p.
- Riousset L., Riousset G. 1988. *Tuber requienii* Tulasne L.R. & C. une espèce méconnue. Bull Soc Et Sci Nat Vaucluse, n.s., 58^e année, 73-80
- Riousset L., Riousset G. 1990. *Tuber oligospermum* (L. & Ch. Tulasne) J.M. Trappe, espèce mal connue. Il Fungo (suppl ; n°4), 12-13
- Riousset L., Riousset G. 1993. *Tuber oligospermum* (Tulasne & Tulasne) Trappe, une espèce mal connue. Bull Fed Assoc Mycol Méditerran., n.s., 36-39
- Riousset L., Riousset G., Chevalier G., Bardet M.C. 2001. Truffles d'Europe et de Chine. Ed. INRA, 181 p.
- Robert L.M. 1995. The sexual cycle in *Neurospora*. In Biotecology of ectomycorrhizae. Molecular approaches (Stocchi V., Bonfante P., Nuti M.). Plenum Press. New York and London
- Robinson D, Fitter A., 1999. The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. Journal of Experimental Botany, 50 (330), 9-13
- Rossi I., Bertini L.; Amicucci A., Cecchini M., Gregori L., Sacchi A., Zambonelli A., Stocchi V., 2002. Study of a natural *Tuber magnatum* Pico truffière in central Italy. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Roux, C., Séjalon-Delmas N., Martins M., Parguey-Leduc A., Dargent R., Bécard G., 1999. Phylogenetic relationships between european and chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. FEMS Microbiology Letters 180 : 147-155.
- Rubini A, Paolocci F, Granetti B, Arcioni S (2001) Morphological characterization of molecular-typed *Tuber magnatum* ectomycorrhizae. Mycorrhiza 11: 179-185.
- 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
- Saltarelli R., Ceccaroli P., Cesari P., Zeppa S., Potenza L. and Stocchi V., 1999. Strain differences in the mycelium of the ectomycorrhizal *Tuber borchii*. Mycological Research 103, 1524-1528
- Saltarelli R., Ceccaroli P., Vallorani L., Zambonelli A., Citterio B., Malatesta M., Stocchi V. 1998. Biochemical and morphological modifications during the growth of *Tuber borchii* mycelium. Mycol. Res. 102, 403-409
- Sbrana C., Agnolucci M., Bedini S., Lepera A., Toffanin A., Giovannetti M., Nuti M.P., 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on T-borchii mycelial growth. FEMS Microbiol. Lett. 211 (2), 195-201
- Sbrana C., Bagnoli G., Bedini S., Filippi C., Giovannetti M., Nuti M.P., 2000. Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of *Pseudomonas* strains isolated from *Tuber borchii* ascocarps. Can. J. Microbiol. 46 (3), 259-268
- Schardl C.L., Leuchtman A., Chung K.R., Penny D., Siegel M.R., 1997. Coevolution by common descent of fungal symbionts (*Epichloe* spp) and grass hosts. Molecular Biology and Evolution 14 (2), 133-143
- Schärzel C. 1967. Beitrag zum Hypogäenflora des Kantons Basel-Stadt und seiner näheren Umgebung. Schweiz. Zeitschr. F. Pilzkd., 45 (9), 129-141
- Selosse M.A., 1998. Etude de populations de champignons basidiomycètes ectomycorhiziens du genre *Laccaria*,

- introduits ou spontanés sous Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Thèse de l'université Paris XI, Orsay
- Selosse M.A., Jacquot D., Bouchard D., Martin F., Le Tacon F., 1998a. Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Molecular Ecology* 7, 561-573
- Selosse M.A., Martin F., Le Tacon F., 1998b. Survival of an introduced ectomycorrhizal *Laccaria bicolor* strain in a European forest plantation monitored by mitochondrial ribosomal DNA analysis. *New Phytologist*, 140, 753-761
- Selosse M.A., Faccio A., Scappaticci G., Bonfante P., 2004. Chlorophyllous and achlorophyllous specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) are associated with ectomycorrhizal septomycetes, including truffles. *Microbiology Ecology*, 47 (4), 416-42
- Simard S. W., Perry D. A., Jones M. D., Myrold D. D., Durall D. M., Molina R., 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature*, 388, 579-582
- Singer R., 1977. Die gruppe der *Laccaria laccata* (Agaricales). *Plant Systematic and Evolution*. 126, 347-370
- Sisti D., Giomaro G., Cecchini M., Faccio A., Novero M., Bonfante P., 2003. Two genetically related strains of *Tuber borchii* produce *Tilia* mycorrhizas with different morphological traits. *Mycorrhiza* 13(2), 107-115
- Sisti D., Zambonelli A., Giomaro G., Rossi I., Ceccaroli P., Citterio B., Benedetti P.A., Stocchi V., 1998. *In vitro* mycorrhizal synthesis of micropropagated *Tilia platyphyllos* Scop. plantlets with *Tuber borchii* Vittad. mycelium in pure culture. *Acta Horticult.* 457, 379-387
- Smit E., Leeftang P., Glandorf B., Van Elsland J.D., Wernars K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2614-26
- Smith S.E., Read D.J., 1997. *Mycorrhizal symbiosis* (second edition). Academic press, London, UK. 605 p.
- Soragni E., Bolchi A., Balestrini R., Gambaretto C., Percudani R., Bonfante P., Ottonello S., 2001. A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A2 in the symbiotic fungus *Tuber borchii*. *In EMBO J.* 20(18), 5079-5090.
- Sourzat P., 1994. Guide de trufficulture. L.P.A. Le Montat eds, Cahors, 96 p.
- Szmerle L. 1965. *Die unterirdischen Pilze des Karpatenbeckens*. Académia Kiado, Budapest, 319 p.
- Templeton A.R., 1998. Nested clade analyses of phylogenetic data: testing hypothesis about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7: 381-397
- Templeton A.R., Routman E., Phillips C., 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, *Genetics*, 140, 767-782.
- Thöen D. 1988. Catalogue des champignons de Belgique et du Grand-Duché de Luxembourg. *Dumortiera*, 41, 4-18.
- Thompson J.N., Cunningham B.M., 2002. Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature* 417:735-738
- Thompson J.N., Nuismer S.L., Gornikiewicz R., 2002. Coevolution and maladaptation *Integrative and Comparative Biology* 42 (2), 381-387
- Thompson J.N., 1989. Concepts of coevolution. *Trend Ecol Evol* 4:179-183
- Thorn R.G., Reddy C.A., Harris D., Paul E.A., 1996. Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4288-4292
- Trappe J.M., 1979. The orders, families and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9 : 297-340.
- Urban A., Neuner-Plattner I., Krisai-Greilhuber I., Haselwandter K., 2004. Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. *Mycological Research*, 108 (7), 749-58.
- Urbanelli S., Sallicandro P., De Vito E., Bullini L., Biocca E., 1998a. Biochemical systematics of some species in the genus *Tuber*. *Mycologia*, 90, 537-546
- Urbanelli S., Sallicandro P., De Vito E., Bullini L., Palenzona M., Ferrara AM 1998b. Identification of *Tuber* mycorrhizae using multilocus electrophoresis. *Mycologia* 90 (3): 389-395.
- Vallorani L., Bernardini F., Sacconi C., Pierleoni R., Pieretti B., Piccoli G., Buffalini M., Stocchi V., 2000. Identification of *Tuber borchii* Vittad. mycelium proteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using amino acid analysis and sequence tagging. *Electrophoresis*, 21 (17), 3710-3716
- Vallorani L., Polidori E., Sacconi C., Agostini D., Pierleoni R., Piccoli G., Zeppa S., Stocchi V., 2002. Biochemical and molecular characterization of NADP glutamate dehydrogenase from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii*. *New Phytol.* 154 (3), 779-790
- Villarreal-Ruiz L., Anderson I.C., Alexander I., 2004. Interactions between an isolate from the *Hymenoscyphus ericaceae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytologist* 164, 183-192
- Vralstad T., 2004. Are ericoid and ectomycorrhizal fungi part of a common guild ? *New Phytologist* 164, 7-10
- Wang T., Moreno G., Riouset L.J., Manjon J.L., Riouset G., Fourre G., Di Massimo G., Garcia-Montero L.G., Diez J., 1998. *Tuber pseudoexcavatum* sp nov, a new species from China commercialised in Spain, France and Italy, with additional comments on Chinese truffles. *Cryptogam. Mycol.* 19 (1-2), 113-120.
- Weden C., Danell E., Camacho F.J., Backlund A., 2004. The population of the hypogeous fungus *Tuber aestivum* syn. *T. uncinatum* on the island of Gotland. *Mycorrhiza*, 14 (1), 19-23
- Weig M., Haynes .K, Rogers T.R., Kurzai O., Frosch M., Muhlschlegel F.A., 2001. A GAS-like gene family in the pathogenic fungus *Candida glabrata*. *Microbiology-SGM* 147 (8): 2007-2019
- Weiss M., Mikolajewski S., Peipp H., Schmitt U., Schmitt J., Wray V., Strack D., 1997. Tissue-specific and development-dependent accumulation of phenylpropanoids in larch mycorrhizas. *Plant physiology*, 114, 15-27
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.D. (Eds.), *PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, 315-322
- Wright S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*, Vol. 4. *Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago
- Wu B., Nara K., Hogetsu T., 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9, 151-159
- Zacchi L., Vaughan-Martini A., Angelini P., 2003. Yeast distribution in a truffle-field ecosystem. *Annals of Microbiology*, 53 (3), 275-282
- Zambonelli A, Branzanti M.B., 1989. Mycorrhizal synthesis of *Tuber albidum* Pico with *Castanea sativa* Mill. And *Alnus cordata* Loisel. *Agricultural Ecosystems, Environmental*, 563-567
- Zambonelli A, Branzanti M.B., 1990. Competizione fra *Tuber albidum* e alcuni basidiomiceti nella formazione di ectomicorrizze su semenzali di *Pinus pinea*. *Atti del 2° Congresso internazionale sul tartufo, Spoleto 24 Novembre 1988*, 443-449
- Zambonelli A., Iotti M., Giomaro G., Hall I., Stocchi V., 2002. *T. borchii* cultivation : an interesting perspective. *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation*. *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Zeppa S., Giocchini A.M., Guidi C., Guescini M., Pierleoni R., Zambonelli A., Stocchi V., 2004. Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18 (2), 199-205
- Zeppa S., Guidi C., Zambonelli A., Potenza L., Vallorani L., Pierleoni R., Sacconi C., Stocchi V., 2002. Identification of putative genes involved in the development of *Tuber borchii* fruit body by mRNA differential display in agarose gel.

- Current Genetics 42 (3), 161-168
- Zeppa S., Potenza L., Polidori E., Guescini M., Agostini D., Giomaro G. and Stocchi V. 2001. Cloning and characterization of a polyubiquitin gene from the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. In *Curr. Genet.* 40(1), 49-53
- Zeppa S., Vallorani L., Potenza L., Bernardini F., Pieretti F., Guescini M., Giomaro G. and Stocchi V., 2000. Estimation of fungal biomass and transcript levels in *Tilia platyphyllos*-*Tuber borchii* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiol. Lett.* 188, 119-124
- Zeringue H.J., McCormick S.P., 1989. *J. Am. Chem. Soc.*, 66, 581
- Zhang D.X., Hewitt G.M., 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584
- Zhou Z., Hogetsu T., 2002. Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. *New Phytologist*, 154, 529-539
- Zhou Z., Miwa M., Matsuda Y., Hogetsu T., 2001. Spatial distribution of the subterranean mycelia and ectomycorrhizae of *Suillus grevillei* genets. *Journal of Plant Research*, 114, 179-185

2. RESULTATS

2.1 Etude de la variabilité génétique de la truffe noire du Périgord, *Tuber melanosporum* Vittad.

Dans cette partie, je me suis intéressé à la diversité génétique de *T. melanosporum*. Lors de mon DEA j'avais étudié sept régions génomiques (SCAR) par séquençage direct sur un échantillonnage d'ascocarpes récolté dans plusieurs régions. Malheureusement ces loci n'ont pas montré de polymorphisme. En revanche, j'avais trouvé plusieurs haplotypes pour l'ITS.

Nous avons donc décidé d'utiliser ce marqueur pour étudier la variabilité génétique de cette truffe. Pour cela, nous avons échantillonné 188 ascocarpes dans toutes les régions productives françaises. À la différence de Bertault et al. (1998), nous avons élargi notre analyse aux régions du nord de la France (Bourgogne et Lorraine) représentant la limite de production de *T. melanosporum*. Le séquençage direct de l'ITS pour ces ascocarpes a permis l'identification de 10 haplotypes. L'étude de leur distribution géographique dans les populations a montré une importante différenciation génétique confirmée par les valeurs de F_{st} (0,20), N_{st} (0,22) et G_{st} (0,22). Cette différenciation génétique était d'autant plus grande si l'on comparait les régions de l'Est et de l'Ouest du Massif Central. Une analyse phylogéographique (*Nested Clade Analysis*) a montré une association entre les haplotypes et les régions et a permis de suggérer que l'actuelle structure génétique de *T. melanosporum* serait due à une fragmentation ancestrale correspondant à deux lignées séparées par le Massif Central.

L'analyse des données disponibles sur la structure génétique des populations de chênes, nous a permis de suggérer que la truffe aurait pris refuge dans le sud de l'Italie associée à ses hôtes. Nous émettons l'hypothèse que ces deux lignées correspondent à deux voies de recolonisation post-glaciaire à partir d'une population du sud de l'Italie. À la fin de la glaciation, les truffes auraient suivi leurs hôtes et auraient recolonisé la France par deux voies : la voie de la vallée du Rhône et la voie de l'Atlantique.

Ces résultats ouvrent la voie à l'identification d'écotypes et de flux de gènes entre populations de *T. melanosporum*. Ces études sont fondamentales pour la réalisation d'Appellations d'Origine Contrôlée de cette truffe qui a un important impact économique (cf. § 1.2.1.2).

Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*

Claude Murat^{1,2,5}, Jesús Díez^{1,3,5}, Patricia Luis^{1,6}, Christine Delaruelle¹, Chantal Dupré⁴, Gérard Chevalier⁴, Paola Bonfante² and Francis Martin¹

¹UMR INRA/UHP 1136 'Interactions Arbres/Micro-Organismes', Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France; ²Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Torino, Viale Mattioli I-10125 Torino, Italy; ³Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Spain; ⁴UMR 1095 INRA-UBP 'Amélioration et Santé des Plantes', Site de Crouelle, 234 avenue du Brézet, F-63039 Clermont-Ferrand Cedex 2, France; ⁵These authors contributed equally to this work; ⁶Present address: Institut für Botanik – Terrestrische Ökologie, Universität Leipzig – Johannisallee 21–23 D-04103 Leipzig, Germany

Summary

Author for correspondence:
Francis Martin
Tel: +33 383 39 40 80
Fax: +33 383 39 40 69
Email: fmartin@nancy.inra.fr

Received: 18 March 2004
Accepted: 19 May 2004

- Glaciations and postglacial migrations are major factors responsible for the present patterns of genetic variation we see in natural populations in Europe. For ectomycorrhizal fungi, escape from refugia can only follow range expansion by their specific hosts.
- To infer phylogeographic relationships within *Tuber melanosporum*, sequences of internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8S coding region of the ribosomal DNA repeat were obtained for 188 individuals sampled over the entire distribution of this species in France, and in north-western Italy and north-eastern Spain.
- Ten distinct ITS haplotypes were distinguished, mapped and treated using *F*- and N_{ST} -statistics and nested clade (NCA) analyses. They showed a significant genetic differentiation between regional populations. NCA revealed a geographical association of ITS haplotypes, an old fragmentation into two major groups of populations, which likely colonized regions on different sides of the French Central Massif.
- This re-colonization pattern is reminiscent of the one observed for host trees of the Perigord truffle, such as oaks and hazelnut trees. This suggests that host postglacial expansion was one of the major factors that shaped the mycobiont population structure.

Key words: ectomycorrhizal fungi, genetic differentiation, nested clade analysis, phylogeography, ribosomal DNA, truffle.

New Phytologist (2004) **164**: 401–411

© *New Phytologist* (2004) doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01189.x

Introduction

The Quaternary climatic fluctuations dramatically influenced the distribution of the flora and fauna in Europe (Hewitt, 1999). Repeated climate changes and the advance of glaciers forced animal and plants to retreat to southern refugia. The biota expanded after the last glaciations when the climate became warmer (Hewitt, 1996). Extensive studies on the postglacial expansion of animals and plants (Taberlet *et al.*, 2001), including forest trees (Petit *et al.*, 2003), contrast with

the lack of knowledge on the populations of rhizospheric microorganisms. Ectomycorrhizal fungi are root-associated mutualistic symbionts of trees in boreal and temperate forests (Smith & Read, 1997) and their populations have probably been shaped by the reduction and expansion of the forests.

The Perigord truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) is an ascomycete endemic to calcareous soils in southern Europe and is found in symbiotic association with roots of deciduous trees, mostly oaks (*Quercus* spp.) and hazelnut trees (*Corylus avellana*) (Delmas, 1978). The fruiting body of *T. melanosporum*

is an edible truffle (= hypogeous ascocarp), which is highly appreciated for its delicate organoleptic properties (i.e. taste and perfumes) (Hall *et al.*, 2003). The high prize of the Périgord truffle has prompted the development of its culture through man-made inoculation of seedlings (Chevalier & Grente, 1978; Chevalier & Dupré, 1990). It can be assumed that the natural distribution and genetic structure of populations of this black truffle species have been structured by at least five major factors: first the distribution of its host plant species (i.e. ectomycorrhizal deciduous trees); second the spore dispersal by mycophagous animals; third limiting ecological factors (calcareous soils and a temperate climate); fourth geographical barriers (i.e. Mediterranean Sea, which limits its expansion towards North Africa), and fifth historical events (i.e. northward re-colonization routes from glacial refugia in southern Europe). The genetic diversity of *T. melanosporum* is strikingly low (Gandebœuf *et al.*, 1997) and a population bottleneck probably occurred during the last, and coldest, glaciation (c. 10 000 yr ago), when the broadleaved forest of Europe was considerably reduced and restricted mainly to the Mediterranean coastal zone (Bertault *et al.*, 1998, 2001). To our knowledge, the analysis of genetic differences among southern populations of *T. melanosporum* and those occurring at the northern limits of this truffle species expansion (i.e. north-eastern France) has not yet been analyzed. Information on the genetic differentiation among these populations may shed light on postglacial phylogeography of this edible fungus.

We assessed the genetic variability of *T. melanosporum* isolates by sequencing the rDNA ITS and five sequenced characterized amplified regions (SCAR). Methods based on *F*- and *N_{ST}*-statistics showed a genetic differentiation between populations. As these methods did not detect historical events (e.g. fragmentation or range expansion) that affected the populations, we implemented our genetic study with nested clade analysis (NCA) (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998, 2004) to shed light on the possible migration processes after the last glaciation. These analyses strengthened the 'glaciation hypothesis' (Bertault *et al.*, 1998) with a rapid colonization of Western Europe from relict Italian populations of *T. melanosporum*. The identified migration routes in France are similar to those observed for oaks species (e.g. *Quercus pubescens*) and other hardwood tree species (Petit *et al.*, 2002a, 2003) which can host *Tuber* species.

Materials and Methods

Sampling sites

The study organism, *Tuber melanosporum* Vittad. (Ascomycota, Pezizomycotina, Pezizomycetes, Pezizales, Tuberaceae), is endemic to France and certain areas of Southern Europe in Italy and Spain, and occurs only in calcareous soils in association with deciduous trees. This black truffle does not tolerate the cold temperatures of high mountains of northern

Europe. These ecological requirements cause a fragmented distribution of *T. melanosporum* in France (Callot *et al.*, 1999). For instance, this fungus is absent from the acid and coldest regions of the Central Massif and the Alps, and the acidic sandy soils of Landes (south-western France). Our sampling strategy aimed to cover the natural geographical range of *T. melanosporum* in France to investigate whether genetic variation among regional populations occurs. Fruiting bodies of *T. melanosporum* were collected in natural truffle grounds in 17 geographical regions of France, northern Italy (Piedmont) and north-eastern Spain (Iberian Mountains) (Supplementary material Table 1). For the analysis of molecular variance (AMOVA) and nested clade analysis (NCA), the 17 sampled regional populations were pooled to have sufficient sample sizes for meaningful comparisons in seven larger geographical areas corresponding to: first Lorraine, the northernmost known limits of expansion; second Burgundy; third the calcareous Pre-Alps (Isère, Drôme) and southern Jura; fourth the coastal southern France (Rhône Provence, Inner Provence, and Languedoc) and the Pyrenees (Roussillon and Ariège); and fifth the western France regions including the foothills of the Central Massif range (Tarn, Périgord-Quercy, Lower Quercy) and Charentes and Touraine (Fig. 1). Ascocarps from north-western Italy (Piedmont, region 6) and north-eastern Spain (region 7) were pooled and included in our study. Most Spanish samples were from a series of valleys along the Iberian Mountains, a calcareous mountain system that extends c. 400 km along the north-eastern edge of the Meseta (Central Plateau) in Spain. The Italian truffles were sampled in the Val Curone valley (Alessandria area), a sedimentary-calcareous region, which extends at the southern edge of the Po Plain. Owing to the low polymorphism of *T. melanosporum* and its selfing reproduction, a few individuals can reflect the regional populations better than extensive sampling per locality (Bertault *et al.*, 2001). We thus sampled one or two fruit bodies per truffle ground in 120 localities over a wide geographical range (Supplementary material Table 1) for ITS sequencing. A single ITS sequence was analyzed per truffle ground (except when several ITS haplotypes were found) to avoid bias linked to the repeated use of ascocarps originating from the same clonal mycelium. Fruit bodies were collected with the help of local pickers and trained dogs in natural truffle grounds during winter from December 1998 to February 2003. Precise geographical information is not provided to protect the truffle grounds from furtive harvesting. Each ascocarp was washed, its peridium peeled and its inner part (= gleba) was conserved at -80°C pending DNA extraction.

DNA manipulations

Total DNA was extracted from 20 mg of gleba with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen SA, Courtabœuf, France) following the manufacturer's instructions. Single nucleotide polymorphisms (SNP) were sought in the rDNA internal

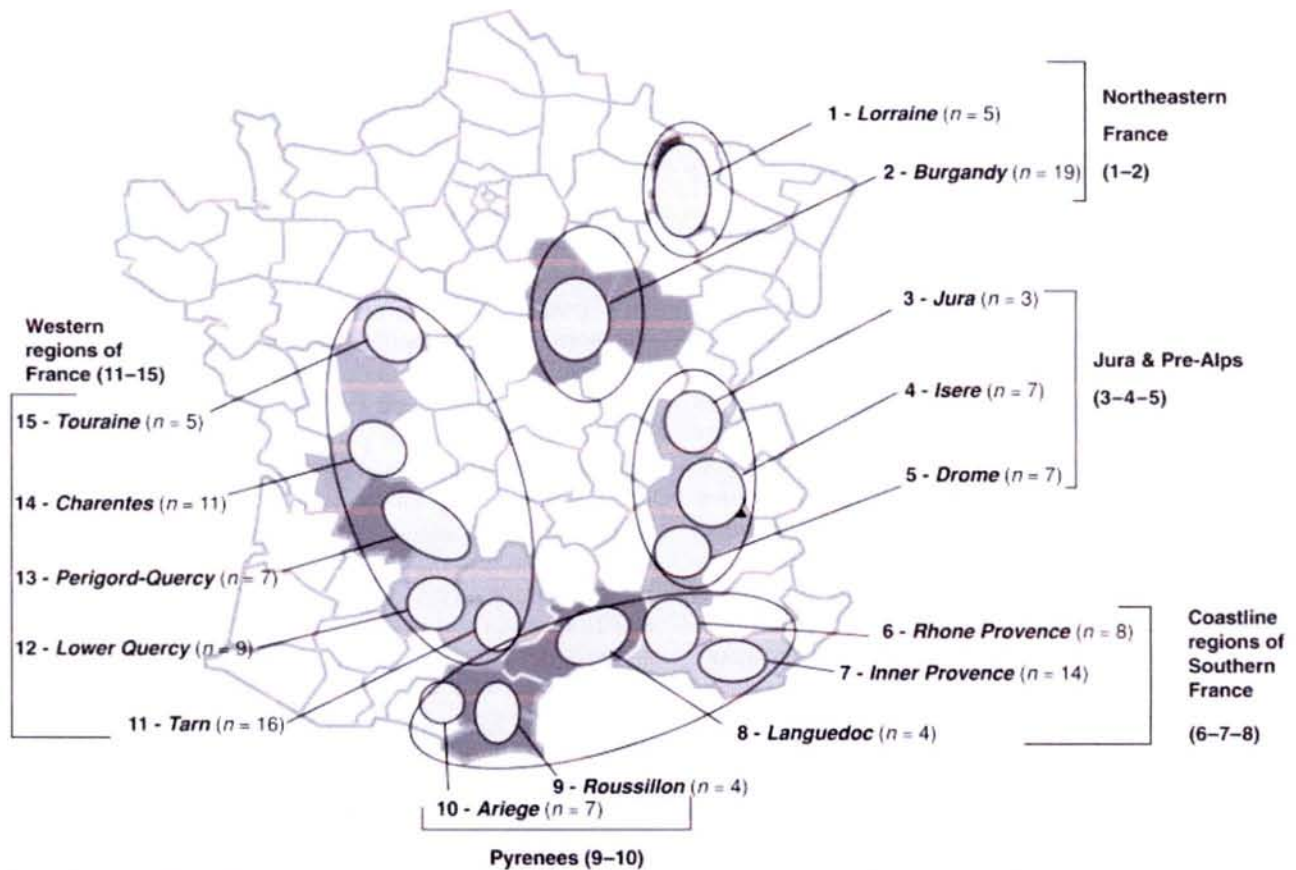


Fig. 1 Map of France showing the regions where accessions of *Tuber melanosporum* were sampled. Borders of the French administrative departments are outlined. The number of samples for each population is given in brackets (n). See Supplementary material Table 1 Data for details on sampling sites. The groupings of regional populations used in the analysis of molecular variance (AMOVA) are indicated.

transcribed sequences (ITS) and in randomly amplified genomic sequences (SCAR). Amplification and sequencing of the nuclear rDNA ITS from 188 specimens were carried out as previously described (Henrion *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2002). Sequencing of rare ITS haplotypes was carried out at least twice on different DNA extracts to rule out any amplification and sequencing artefacts. RAPD amplifications were carried out with primers E4, E20, and G14 (Operon Technology, Alameda, CA, USA), using the conditions described by Gandeboeuf *et al.* (1997). Five nonpolymorphic RAPD bands were cloned and sequenced from the specimen MEst collected in Bauduen (Var, France). RAPD products were ligated into a pCR4-TOPO plasmid vector of a TOPA-TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen, The Netherlands). Both strands of inserts were sequenced with a *Taq* Big DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and analyzed with an ABI 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequences were assembled using Sequencher 3.1.1 (GeneCodes, Ann Arbor, MI, USA) and SCAR primers were designed (available upon request). For a set of specimens representative of the different regional populations, we amplified the SCAR sequences using primers herein designed and PCR conditions used for

ITS amplifications. The sequences of ITS and SCARs were deposited in GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI). Accession numbers are provided in Supplementary material Table 1. SNPs were detected by sequence multialignments using the 'assembly contig' routine of Sequencher 3.1.1.

Data analyses

We used three approaches to investigate genetic differences among regional populations: first the index of fixation (Wright, 1978) implemented with AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992); second N_{ST} -statistics (Pons & Petit, 1996); and third NCA (Templeton, 1998, 2004). The AMOVA analyses was carried out with ARLEQUIN 2.001 (Excoffier *et al.*, 1992), which calculated Φ_{ST} analogous to Wright's F_{ST} . We partitioned the genetic variation between three hierarchical components: among seven groups of regional populations (i.e. geographical areas), among 17 regional populations and within regional populations (Fig. 1). Fixation index was calculated for the whole geographical range, between the seven groups of regional populations, and between all region pairs (Schneider *et al.*, 2000). A Neighbor-Joining (NJ)

dendrogram was constructed using Slatkin's genetic distance calculated in ARLEQUIN, to analyze the relationship between genetic distance among regional populations with their relative geographical positions. The Neighbor-Joining analysis was carried out using PAUP4.08b (Swofford, 2002). Genetic differentiation among the seven groups of regional populations and among the 17 regional populations was also tested applying N_{ST} -statistics (Pons & Petit, 1996) using the programme PERMUT (available from <http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>). This test compares N_{ST} with values of G_{ST} . N_{ST} estimates consider not only differences in the frequencies of haplotypes between populations, as with G_{ST} , but also genetic distances between haplotypes. In cases of correspondence between haplotype phylogenies and their geographical distribution, estimates for N_{ST} will be greater than G_{ST} values (Pons & Petit, 1996).

We used a Mantel test to analyze a potential correlation between geographical (Km) and genetic distance and to estimate the effect of isolation-by-distance (Rousset, 1997; Hutchison & Templeton, 1999). A matrix of distances among the seven groups of regional populations or the 17 regional populations was calculated with the module GEODISTANCES of the Package R. 4.0d3 (Casgrain & Legendre, 2001), which used latitudes and longitudes. Mantel statistics were calculated in ARLEQUIN on the matrices of geographical distances [Ln (distance in Km)] and genetic distance as Slatkin's linearized pairwise $\Phi_S(\Phi_{ST}/1 - \Phi_{ST})$; Slatkin, 1995). The significance of the correlations was tested by 9999 random permutations.

The null hypothesis that there is no geographical association between sequence types and geographical localities (i.e. populations) was tested by permutation (10 000 replicates) using the program CHIPERM version 1.2 (Posada, 2000; available at: http://bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/programs.htm). We then estimated a sequence-type network using the programme TCS (Clement *et al.*, 2000), which uses statistical parsimony (Crandall, 1996) for network estimation. The maximum number of mutational steps that constitute a parsimonious connection between two sequence types was calculated with 95% confidence. The resulting network was used to construct the nested clade design with TCS (Clement *et al.*, 2000). NCA has become a common tool in intraspecific phylogeography (Templeton, 2004) and has been used to investigate phylogeographic relationships of rDNA ITS haplotypes (James *et al.*, 2001; Rodríguez-Lanetty & Hoegh-Guldberg, 2002; Wörheide *et al.*, 2002). After the nesting procedure, we employed the NCA of geographical distances (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998, 2004) using the program GEODIS version 2.0 (Posada *et al.*, 2000), with 10 000 permutations. GEODIS addresses the sampling strategy adequacy and quantifies the degree of confidence in the quantitative distance measure by testing the null hypothesis that the haplotypes (or clades) nested within a high nested clade show no geographic associations given their overall sample numbers.

The NCA of geographical distances, as implemented in the program GEODIS, has two parts. Part one looks for statistically significant geographical associations of sequence types by permutational X^2 statistics for each clade. Then part two, using different geographical information, estimates two different geographical parameters for each clade in the nested design. $D_c(x)$, the clade distance, measures the average distance of each member of a clade from its geographical centre and measures how geographically widespread are the individuals that bear haplotypes from this clade, that is $D_c(x)$ is a measure for the geographical range of clade x . $D_n(x)$, the nested clade distance, measures the average geographic distance of all members of a clade from the geographical centre of its higher-level nesting clade, which is also estimated by averaging the coordinates of all members of the higher-level nesting clade. $(I-T)D_c$ and $(I-T_n)D_n$ give the average D_c and D_n values for all the interior clades within a nesting clade minus the average D_c and D_n values for all the tip clades in the same nesting clade. All calculated distances can either be significantly large, small or nonsignificant. Significant values from the second part of the analysis are then used to work with the inference key (Templeton, 2004) (available at http://bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/geodis.htm) to infer patterns of population structure, population history or a combination of both. The last version of the inference key reduces the incidence of false positive to a minimum at a cost of a slight reduction in power (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998; Cruzan & Templeton, 2000; Templeton, 2004). However, one must be cautious in inferring cause and effect in NCA analyses (Knowles & Maddison, 2002). Criticisms of Knowles & Maddison (2002) and Hey & Machado (2003) regarding NCA do not, however, apply to our study as NCA performed well in the case of range expansion (Templeton, 2004). The criticism of Petit & Grivet (2002), that genetic fixation within populations can bias the outcome of NCA, should not apply to our data, as we analyzed single individuals from isolated truffle grounds.

Results

SNP analyses and haplotype frequencies in regional populations

Sequencing 50 kbp of the PCR-amplified SCAR fragments from a representative set of *T. melanosporum* fruit bodies from the different geographical areas revealed no SNP. By contrast, there were nine variable sites corresponding to 10 different haplotypes (Table 1) across all 188 ITS sequences. For the statistical analyses, only one fruiting body was considered from each truffle ground to avoid the possibility of sampling ascocarps originating from the same fungal individual mycelium. A total of 148 ITS sequences were finally analyzed. ITS haplotypes (variants) I and II were the most common haplotypes (60% and 28%, respectively), whereas haplotype

Table 1 Single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the 10 rDNA ITS haplotypes of *Tuber melanosporum* found among 188 specimens collected throughout its natural range in 17 regions in France, north-western Italy (Piedmont) and north-eastern Spain (Iberian Mountains)

Haplotypes	Regional populations	Nucleotide position																		
		0	1	2	3	4	4	5	5	0	3									
		7	3	2	5	9	9	7	4	5										
I	All, except Languedoc	T	C	C	C	C	C	C	T	G										
II	All, except Jura, Roussillon, Ariège & Touraine	G	.	.	.	T	.	.	.	C										
III	Burgundy, Piedmont, Inner Provence & Languedoc	C										
IV	Tarn	G										
V	Ariège	.	.	T										
VI	Ariège	T	.	.	.										
VII	Tarn	G	.	.	.	T	.	T	.	C										
VIII	Jura	G	.	.	.	T	.	G	.	C										
IX	Drome	G	.	A	T	C										
X	Languedoc	.	G	C										

The most frequent haplotype (haplotype I) was used as the reference sequence. Identical nucleotides are indicated by dots. Regions where haplotypes were sampled are indicated (see Supplementary Material Table 1 for details).

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) of ITS haplotypic diversity for 17 regional populations within France, north-western Italy and north-eastern Spain

Source of variation	d.f.	SDD	Variance components	% Total
Among groups of regional populations	6	20.490	0.1213	16.52
Among populations within groups	10	16.982	0.02480	3.38
Within populations	131	11.344	0.58816	80.10
Total	147	77.048	0.73427	100.0

The analyses were carried out using 148 collections from different truffle grounds (see sampling localities in Supplementary Material Table 1). Variance was partitioned among groups of regional populations (i.e. geographical areas), among regional populations within these areas, and within regional populations (see Fig. 1). Degrees of freedom (d.f), sums of square deviations (SSD), variance component estimates, and the percentages of the total variance (% Total) contributed by each component. $F_{ST} = 0.20$, P -value < 0.001.

III was less frequent (7%) (Supplementary material Table 1). The remaining haplotypes presented a very low frequency (< 2%). These 10 haplotypes showed a differential geographical distribution (Supplementary material Table 1; Fig. 2). Haplotypes I and II were distributed widely in most sampling sites in France, Italy and Spain, whereas the other haplotypes presented a geographically restricted range. Haplotype I was more frequent in the western French Atlantic regions (e.g. 90% of ascocarps in Charentes) than in populations in eastern and north-eastern France (e.g. 20% in Burgundy). By contrast, haplotype II was more frequent in eastern France and north-western Italy (e.g. 71% in Iserre and 54% in Italian Piedmont) (Fig. 2). Haplotype III presented a disjunct distribution and was found only in Burgundy (32%), Inner Provence (6%), Languedoc (25%), and Piedmont (18%). Haplotypes IV to X were distributed locally and were restricted to single truffle grounds (Supplementary material Table 1; Fig. 2). Additional surveys are, however, needed to confirm the regional ITS haplotype frequencies in the smaller populations.

Genetic differences among regional populations

A F_{ST} value of 0.20 ($P < 0.001$) indicates a significant genetic differentiation among *T. melanosporum* populations (Wright, 1978). A test of correspondence, carried out using PERMUT (Pons & Petit, 1996), confirmed this genetic differentiation ($N_{ST} = G_{ST} = 0.22$). Since the large geographical areas (eastern and western France) were further subdivided into regions occupied predominantly by a few haplotypes (Supplementary material Table 1; Fig. 2), hierarchical partitioning of variation (AMOVA) was conducted within the 17 regional populations, among regional populations, and between geographical areas (i.e. groups of regional populations). The bulk of the total haplotype diversity was found within populations (c. 80%). Additional variation was attributable to differences among populations within a geographical area (c. 3%) (Table 2). A significant variation (c. 17%) was attributable to the difference between geographical areas (groups of regions). The higher pairwise genetic distance value was found for populations found on the eastern and western sides of the Central Massif (i.e. Atlantic regions vs Rhone valley). A NJ dendrogram of F_{ST} genetic distances reflected the geographical distribution of the

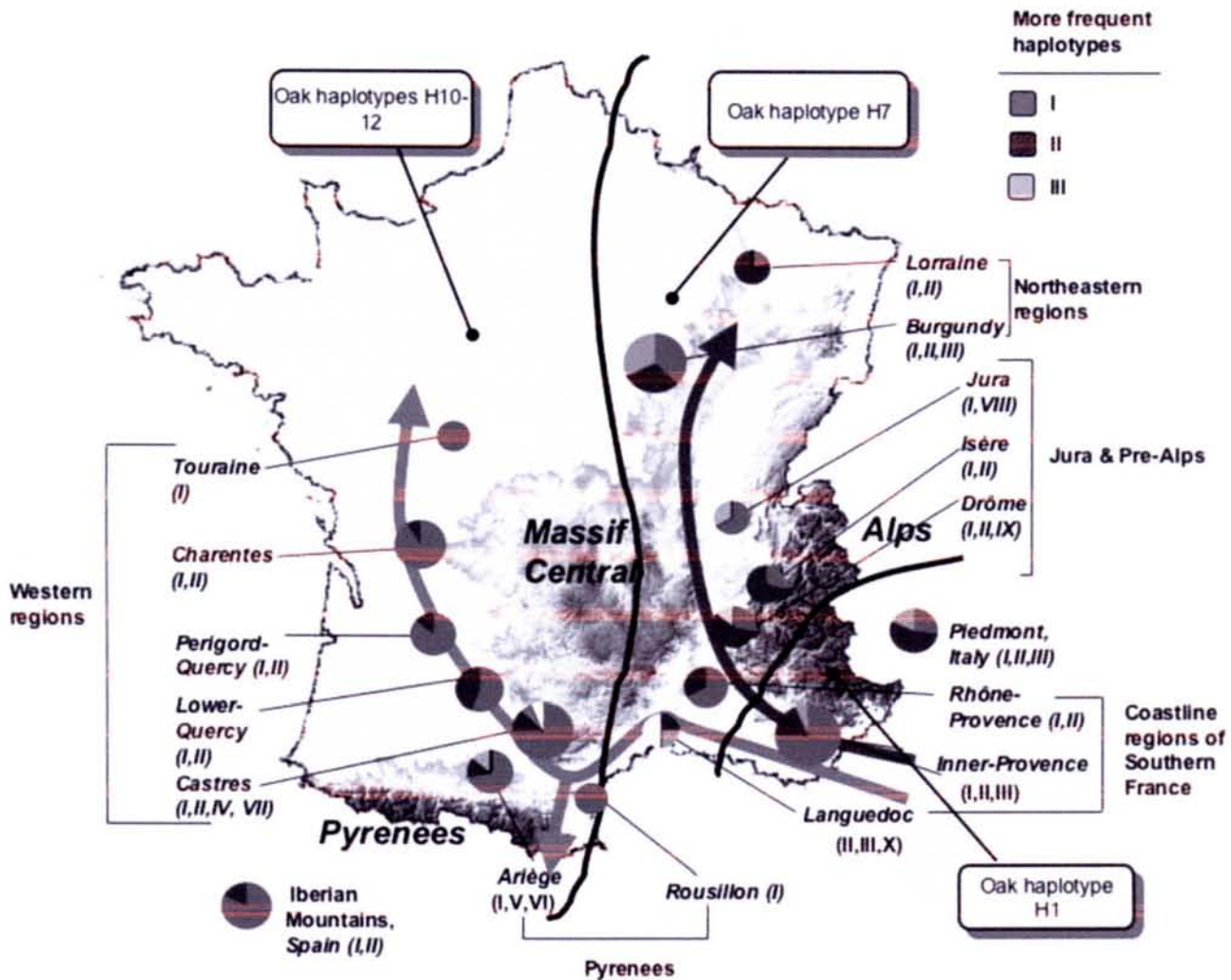


Fig. 2 Distribution of ITS haplotypes of *Tuber melanosporum* in France. The pie chart diameters are proportional to the number of ascocarps analyzed per region. Black lines delimit areas of distribution of the chloroplast DNA (cpDNA) haplotypes of oaks in France (Petit *et al.*, 2002a): haplotype 1 was found in the southern corner of France; haplotype-7 in the Rhone valley, and haplotypes 10–12 in western France. Arrowed lines show potential postglacial re-colonization routes for the Perigord truffler: the Atlantic route and the Rhone valley route.

haplotypes described above (Fig. 3). Two main clusters were characterised: populations of the 'western' cluster have a frequency of haplotype I higher than haplotype II and presented rare haplotypes (e.g. IV & VII in Tarn). The populations within the 'western' cluster were characterized by a low frequency of haplotype II, and included populations found in the Pyrenees, western Atlantic regions and southern France (e.g. haplotype V and VI in Ariège). Populations of the 'eastern' cluster have a higher frequency of haplotype II and were found in north-eastern France (Lorraine), and in the Alps (Drome, Isere, Piedmont). Burgundy presented similar percentages of haplotypes I and II and nested outside the main clusters. Thus, the F -statistics showed that the position of the regional populations related to the Central Massif range impacted the haplotype frequencies in the populations and the genetic distances among them.

According to N_{ST} -statistics ($N_{ST} = G_{ST}$), there is no or only weak overall correspondence between the haplotype phylogenies

and geographical distribution (Pons & Petit, 1996). This result is presumably the result of the wide geographical codistribution of the most numerous haplotypes (I & II). However, the NJ tree based on the F_{ST} genetic distances between ITS haplotypes (Fig. 3) joined adjacent subregions. The increase in genetic differentiation with geographical distance was marginally significant (Mantel test, $P = 0.036$). However, the genetic difference drastically increased for population pairs located on different sides of the Central Massif suggesting a potential geographical isolation by this mountainous range. The AMOVA (Table 2), the N_{ST} test (data not shown), the NJ tree (Fig. 3), and the Mantel test (data not shown) were not significantly affected by the small size of several of the analyzed populations and the low frequencies of the rare alleles as shown by analyses performed using only subsamples of the entire populations (data not shown). For example, F_{ST} , N_{ST} and G_{ST} values of 0.18, 0.16 and 0.12 were found when the

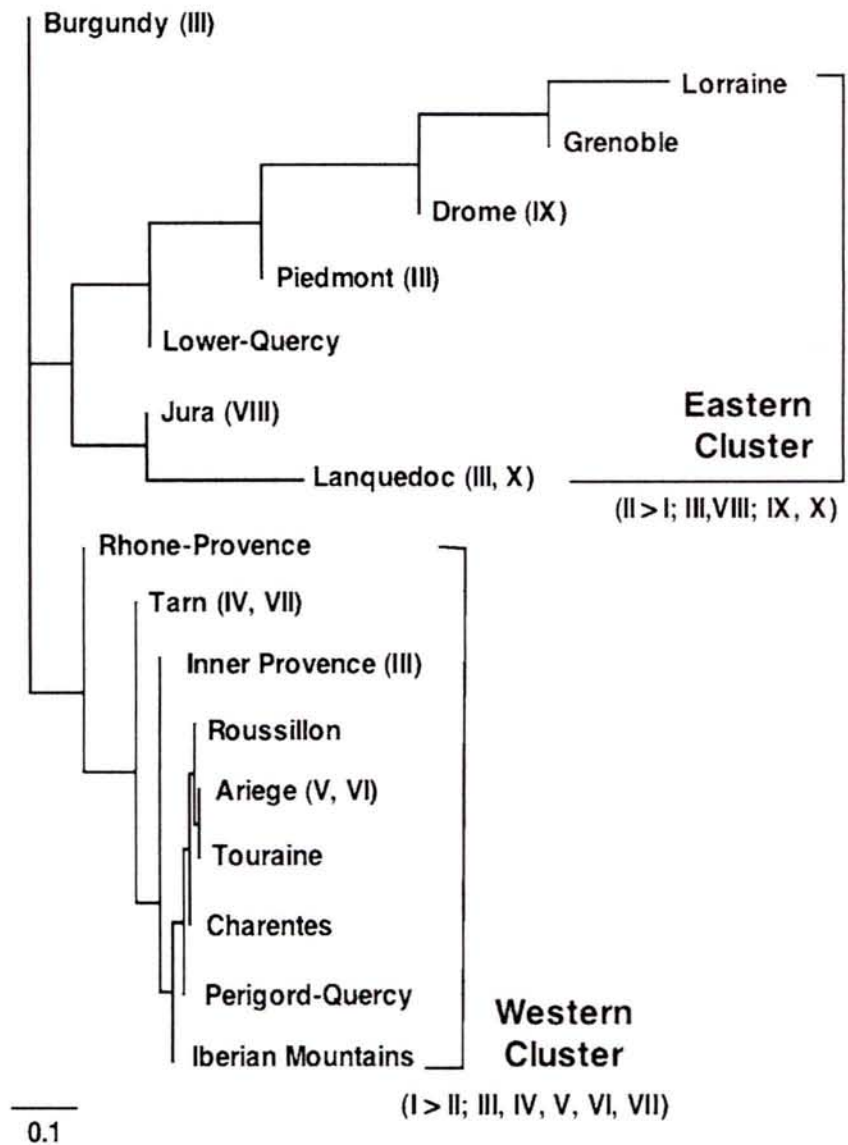


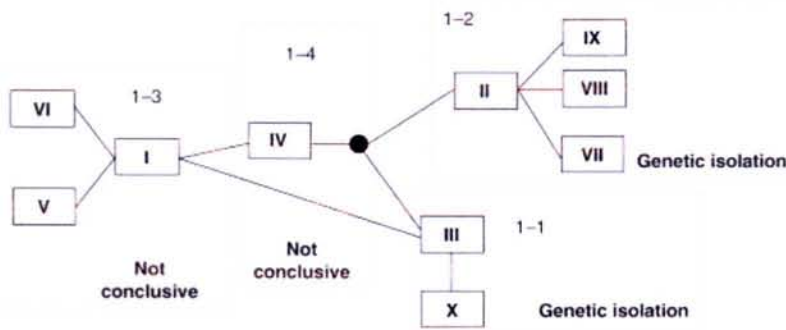
Fig. 3 Neighbour-joining tree of the 17 regional populations sampled in France, north-western Italy (Piedmont) and north-eastern Spain (Iberian Mountains) based on Slatkin's genetic distances. Frequent and rare haplotypes are indicated.

analyses were carried out on the seven larger geographical areas (Fig. 1) confirming the significant genetic differentiation among groups. Most of the results were also obtained even when the analyses were limited to the three common alleles.

Haplotype network and nested design

In this study, we applied a nested clade analysis approach (NCA; Templeton *et al.*, 1995, Templeton, 1998, 2004), to investigate the roles of contemporary ecological processes and population histories in shaping the natural populations of *T. melanosporum* in France. The utility and applicability of ITS rDNA sequences for phylogeography and NCA has been demonstrated in a study of the basidiomycetous species *Schizophyllum commune* (James *et al.*, 2001). The initial test for geographical association of haplotypes revealed a significant association between sequence types and geographical

locations (Monte Carlo significance < 0.001); therefore we proceeded with the NCA. The nested cladogram comprises 11 0-step clades (haplotypes), four one-step clades (1-1, 1-2, 1-3 and 1-4) and one 2-step clade (2-1) (Fig. 4). The 95% connection limit was established at nine steps, far from the largest number of connections detected between two sequences. Ambiguities were evident in only one area of the sequence-type network, where a closed loop between four haplotypes (I, III, IV and one hypothetical one which was not observed) was found. This ambiguous loop did not affect subsequent nesting procedures. The nesting routine of the programme TCS generated three 1-step nested clades. The 1-step nested clades 1-1, 1-2 and 1-3 are tip clades, and clade 1-4 is an interior clade. Haplotypes located at the tips of the cladogram tended to have restricted geographical distributions, whereas ubiquitous, and presumably ancestral haplotypes, were on interior nodes (i.e. haplotypes I to IV) (Templeton *et al.*,



2-1 Past fragmentation

Inference serie:

Clade 2-1: 1 NO, 2 YES, 4 YES, 9 NO

Clade 1-2: 1 YES, 2 YES, 4 NO

Clade 1-1: 1 YES, 2 YES, 4 NO

Clade 1-3 & 1-4: not conclusive

1995). Clade 1-1 comprised the haplotype III found only in northern Italy, and eastern and southern France (Burgundy, Languedoc, and Inner Provence) and the rare haplotype X collected in Languedoc. In clade 1-2 nested the haplotype II (highly frequent in northern Italy and eastern France) and the tip haplotypes VII (Tarn), VIII (Jura) and IX (Drome). The ancestral haplotype I, predominant in western France, nested in clade 1-3 with the rare haplotypes V and VI (Ariege). Finally, a nonsampled haplotype and haplotype IV (Tarn) nested in clade 1-4. The null hypothesis was rejected ($P < 0.0001$) for the overall tree (and for all the clades) showing that our sampling strategy was adequate for the phylogeographic analysis.

The NCA inference analysis (Templeton, 2004) for the two-step clade 2-1 (Fig. 4) indicated a past fragmentation. Such a past fragmentation could account for the different frequency of haplotypes I and II in western and eastern France (see Discussion). The inference series for the more recent outer part of the haplotype tree indicated an isolation of the populations (Fig. 4). In particular, clade 1-2 indicated a restricted gene flow with genetic isolation of populations having the rare haplotypes VII to IX. The analyses of clade 1-1 indicated as well an isolation of the populations, which restricted the dispersion of haplotype X (Languedoc) after arising from haplotype III. The series of inference for clades 1-3 and 1-4 were not conclusive (Fig. 4).

Discussion

The moderate variation of the nuclear rDNA ITS from *Tuber melanosporum* revealed a strong pattern of geographic differentiation. Within 188 isolates collected over the whole

Fig. 4 Nested clade design used for nested contingency analysis of geographical associations of 10 ITS haplotypes of *Tuber melanosporum*. The black dot denotes a hypothetical (not observed) intermediate haplotype. Each line in the network represents one mutational step. Nested design was based on the sequence type network generated by the TCS programme and inferred using the rules defined by Templeton (2004). The Templeton's inference series are given at the bottom of the figure.

geographical distribution of the Perigord truffle, including the northern limits of expansion of this species (Burgundy and Lorraine), 10 distinct haplotypes were distinguished (Table 2; Supplementary material Table 1). One of these, haplotype I, was particularly common, predominant in every population except in eastern France where haplotype II was the most frequent. The presence of one very common haplotype in most populations confirms that this species went through a population bottleneck, after which new allelic haplotypes have originated in low frequencies (Bertault *et al.*, 1998). It appears that some of the southern populations (e.g. Languedoc) had the largest number of haplotypes, while Touraine and Roussillon had only one haplotype each (Fig. 2; Table 1; Supplementary material Table 1), although further surveys (i.e. larger sample size) may modify this distribution. Ascocarps were harvested in different truffle grounds ruling out the sampling of fruiting bodies belonging to the same mycelium.

Index of fixation approach ($F_{ST} = 0.20$), N_{ST} (0.22), and AMOVA showed a significant geographic differentiation between populations. We also found a significant association between genetic (F_{ST}) and geographical distances (Mantel test) when we clustered the distance values between populations in two groups (one with populations from western France and the other formed by the populations of the Rhone Valley). This suggests that geographical factors (e.g. the Central Massif range) may have had an important impact on the gene flow among populations. These analyses were based on a single locus that can represent, at the best, only a snapshot of the evolutionary history of *T. melanosporum* (Beerli & Felsenstein, 1999). The occurrence of significant allelic variation in ITS contrasts with the lack of sequence polymorphisms within the

SCAR sequences. It is thought that concerted evolution limits variation in the ITS and other regions of ribosomal DNA repeat (Ganley & Scott, 2002) and the current data was therefore unexpected. Additional analyses using the vegetative incompatibility gene sequence and microsatellite loci are currently underway to confirm the geographic differentiation deduced from the ITS polymorphism.

Truffle postglacial history suggested by nested clade analysis

Using NCA, it may be possible to infer the factors that generated genetic differentiation between populations and to predict migration routes (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 2004), although its validity and limitations are debated (Knowles & Maddison, 2002; Petit & Grivet, 2002; Templeton, 2004). NCA incorporates the geographical distribution of the haplotypes to the nested phylogenetic relationships among haplotypes to infer population events in historical order (Templeton, 1998). The geographical contingency analysis supported the differences among populations, as Monte Carlo's test for the association of haplotypes with regions was highly significant ($P < 0.001$).

If we accept the 'interior equals oldest' predictions from coalescent theory (Templeton, 1998), then we can infer that the interior haplotypes (I, II and III) of the network are the oldest ones (Fig. 4). All these haplotypes are present in northern Italy, and they likely represented the main haplotypes present in the glacial refugia. This is in agreement with the hypothesis by Bertault *et al.* (1998) of a drastic glacial bottleneck as origin of the low polymorphism of the Perigord truffle, and the reduced number of ITS haplotypes of *T. melanosporum* is consistent with the survival of small and isolated populations in southern Europe refugia. The bottleneck of *T. melanosporum* populations likely occurred during the last and the coldest glacial period (10 000–16 000 yr ago) (Bertault *et al.*, 1998). Such a population bottleneck probably fixed most of the loci, accounting for the lack of SNPs within the SCAR markers (present work). Subsequent expansion from these smaller populations would carry different combinations of ITS haplotypes to colonized areas. The presence of the three ancestral haplotypes of *T. melanosporum* in Piedmont supports the 'Italian peninsula origin' hypothesis (Bertault *et al.*, 1998) with a migration pathway through the Po plain to the western Alps and a subsequent northward expansion along the western and eastern France migration routes. Following Templeton's inference key, we found a statistically significant past fragmentation in the two step clade 2.1. This past fragmentation probably occurred during the colonisation of calcareous foothills along the Central Massif (Fig. 2). Regions having a higher level of diversity (e.g. Languedoc) may correspond to the separation point of the two colonisation routes, whereas regions at the edge of migration routes, such as Touraine and Lorraine, contain only a

subset of the lineages described and therefore exhibit lower levels of allelic richness. After the initial rapid colonization, the Central Massif mountainous range, the mosaic pattern of limestone soils in France and the strict soil requirement of the Perigord truffle may have represented effective barriers limiting the gene flow between regions and maintaining the genetic differences until today. Due to the unfavorable acidic sandy soils of Landes (south-western France), a plausible route to colonize Spanish calcareous regions may have been the eastern coastline of the Pyrenean region, from which the black truffle could reach the calcareous Iberian Mountains in north-eastern Spain (Fig. 2). On the other hand, *T. melanosporum* probably survived in refugia in Spain with haplotype I and II moving out of Spain to colonize western France and types I, II and III coming out of Italy to colonize Eastern France. A more extensive data set from the Iberian Mountains and other Spanish regions will surely provide further clues to support these contrasted scenarii.

Black truffle and its hosts shared the routes of postglacial re-colonization in France

During the maximum expansion of the glaciers, the deciduous forest of Europe was restricted to the Mediterranean coastal zone (Bennet *et al.*, 1991). Climatic and fossil data support the hypothesis that three regions hold the main glacial refugia for the host trees of *T. melanosporum*: the Iberian and Italian Peninsulas, and the Balkans (Comes & Kadereit, 1998; Taberlet *et al.*, 2001). Since *T. melanosporum* is an ectomycorrhizal symbiont of oaks and other temperate deciduous trees, such as *Tilia* and *Corylus* species, this symbiotic fungus was likely restricted to some of these regions. Molecular and fossil (i.e. pollen) data have revealed that the two main northwards re-colonization routes for oaks and many hardwood species (including *Tilia* and *Corylus* species) were the Rhone valley and the western plain of France (Brewer *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2002a; 2002b; 2003). They determined the current distribution of the haplotypes of oak species (e.g. the thermophilous *Quercus pubescens*) in France (Fig. 3 in Petit *et al.*, 2002a). In Provence, the oak haplotype 1 is the most prominent haplotype (Fig. 2). In the Rhone valley, haplotype 7 dominates, whereas the western France populations are dominated by the closely related oak haplotypes 10, 11 and 12. Although edaphic (e.g. calcareous soils) and paleoclimatic factors likely influenced *T. melanosporum* postglacial recolonization patterns, the NCA-suggested routes of expansion for the Perigord truffle in France closely resemble that of *Q. pubescens* (Petit *et al.*, 2002a). It is therefore tempting to speculate that the oak re-colonization routes have impacted on the distribution of *T. melanosporum* populations during their northward migration (Fig. 2). It has already been suggested that the northwards expansion of plant and animal species from southern refugia likely followed the establishment of deciduous woodland. For example, oak and hedgehog species followed similar

expansion patterns (Seddon *et al.*, 2001). Mycophagous animals (e.g. squirrels, wild boar) known to disperse truffle spores probably favored this expansion. Oak species can withstand the cold conditions of northern Europe, while *T. melanosporum* is restricted to mid-latitudes. It is therefore possible that this truffle species migrated northwards later than oaks and thus oaks could have been widespread by the time *T. melanosporum* reached France. These various hypotheses will be investigated using additional methods to infer population histories, and larger fruit body surveys.

Acknowledgements

This project has benefited from a Ph.D. fellowship of the Italian ISASUT (University of Torino) to Claude Murat. J. Díez is a recipient of a 'Ramon y Cajal' Researcher Contract from the Spanish 'MCyT'. We thank Drs J.-L. Jany (Laval University, Québec) and A. Mellò (University of Torino, Italy) for stimulating discussions, and Dr Rémy Petit (INRA-Pierrotton) for discussion and running PERMUT on the current data. The provision of samples by M. L. Ballureau, C. Bazin, F. Beaucamp, P. Berthet, C. Beneteau, C. Bezombes, O. Bois, M. Bomble, I. Calvo, R. Chinouilh, A. Clare, A. Daniël, L. Dangladié, J. P. Ducrét, M. Fayolle, B. Finot, H. Frochot, C. Galoger, A. Goyon, L. Genola, Mr Gillot, F. Gobeau, J. Goubier, A. Guillén, M. Honrubia, H. Huguet, G. Jallifier, Mr Junique, J. L. Lacam, A. Lauriac, Mr Lespinasse, J. Manreza, P. Materne, A. Meunier, M. Mondion, P. Moulin, S. Pallares, J. L. Prune, C. Raquillet, P. Rejou, J. F. Rey, R. Ribes, L. & G. Rioussset, J. M. Rocchia, J. J. Roux, T. Sánchez, P. Sourzat, Y. Soulas, J. P. de Santis, P. Tabouret, A. Terrade, O. Viguier, J. Verbinski and L. Vergé is greatly appreciated. We also would like to thank all authors of freely available genetics software. We are grateful for the useful comments of the referees on an earlier version of the manuscript. This project was funded by grants from the Bureau des Ressources Génétique (research project BRG 69–68), the Institut Français de la Biodiversité (CNRS programme 'Environnement, vie et sociétés'), INRA and the Italian Project 'Tuber: Biotecnologia della micorrizzazione' funded by CNR.

Supplementary material

The following material is available as Supplementary material at <http://www.blackwellpublishing.com/products/journals/suppmat/NPH/NPH1189/NPH1189sm.htm>

Table S1 List of *Tuber melanosporum* specimens and sampling localities used in the present study.

References

Berli P, Felsenstein J. 1999. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763–773.

- Bennet KD, Tzedakis PC, Willis KJ. 1991. Quaternary refugia of North European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103–115.
- Bertault G, Raymond M, Berthomieu A, Callot G, Fernandez D. 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* 394: 734.
- Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M. 2001. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 88: 451–458.
- Brewer S, Cheddadi R, De Beaulieu JL, Reille M. 2002. The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management* 156: 27–48.
- Callot G, Byé P, Raymond M, Pargney JC, Parguey-Leduc A, Janex-Favre MC, Moussa R, Pagès L. 1999. *La Truffe, la Terre, la Vie*. Paris, France: INRA Press.
- Casgrain P, Legendre P. 2001. *The R package for multivariate and spatial analysis*, Version 4.0d3 – User's Manual. URL: <http://www.fasumontreal.ca/BIOLOGIE/legendre/>.
- Chevalier G, Dupré C. 1990. Recherche et expérimentation sur la Truffe et la trufficulture en France. In: Bencivenga M, Granetti B, eds. *2nd Congresso Internazionale Sul Tartufo*. Spoleto, Italy: Comunità Montana dei Monti Martani e del Serano, 157–166.
- Chevalier G, Grente J. 1978. Applications pratiques de la symbiose ectomycorhizienne: production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe (*Tuber melanosporum*). *Mushroom Science* X: 483–505.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Comes H, Kadereit JW. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3: 432–438.
- Crandall KA. 1996. Multiple interspecies transmissions of human and simian T-cell leukemia/lymphoma virus type I sequences. *Molecular Biology and Evolution* 13: 115–131.
- Cruzan MB, Templeton AR. 2000. Paeleocology and coalescence phylogenetic analysis of hypothesis from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 491–496.
- Delmas J. 1978. *Tuber* spp. In: Chang ST, Hayes WA, eds. *The biology and cultivation of edible mushrooms*, London, UK: Academic Press, 645–681.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Gandebouef D, Dupré C, Roocket-Drevel P, Nicolas P, Chevalier G. 1997. Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Canadian Journal of Botany* 75: 36–45.
- Ganley ARD, Scott B. 2002. Concerted evolution in the ribosomal RNA genes of an *Epichloe* endophyte hybrid: comparison between tandemly arranged rDNA and dispersed 5S rRNA Genes. *Fungal Genetics and Biology* 35: 39–51.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21: 433–438.
- Henrion B, Chevalier G, Martin F. 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 98: 37–43.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247–276.
- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hey J, Machado CA. 2003. The study of structured populations – new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535–543.
- Hutchison DW, Templeton AR. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53: 189–194.
- James TY, Moncalvo JM, Li S, Vilgalys R. 2001. Polymorphism at the DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149–161.
- Knowles LL, Maddison WP. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623–2635.

- Martin F, Díez J, Dell B, Delaruelle C. 2002. Phylogeography of the ectomycorrhizal *Pisolithus* species as inferred from the nuclear ribosomal DNA ITS sequences. *New Phytologist* 153: 345–358.
- Petit RJ, Aguinagalde I, De Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Muller-Starck G, Demesure-Musch B, Palme A, Martin JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Petit RJ, Brewer S, Bordacs S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csakl UM, Van Dam B, Deans JD, Espinel S, Finschi S, Finkeldey R, Glaz I, Giocoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Matyas G, Munro MC, Popescu F, Slade D, Tabbener H, de Vries SGM, Ziegenhagen B, de Beaulieu JL, Kremer A. 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49–74.
- Petit RJ, Grivet D. 2002c. Optimal randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure. *Genetics* 161: 469–471.
- Petit RJ, Latouche-Hallé C, Pemonge MH, Kremer A. 2002a. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management* 156: 115–129.
- Pons O, Petit RJ. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Posada D. 2000. *Testing geographic association – Chisperm, version 2.1*. Provo, UT, USA: Department of Biology, Brigham Young University.
- Posada D, Crandall KA, Templeton AR. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487–488.
- Rodríguez-Lanetty M, Hoegh-Guldberg O. 2002. The phylogeography and connectivity of latitudinally widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora* in the western Pacific. *Molecular Ecology* 11: 1177–1189.
- Rousset F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219–1228.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. *ARLEQUIN, Version 2.001: a software for population genetics data analysis*. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Seddon JM, Santucci F, Reeve NJ, Hewitt GM. 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Ericevus europaeus* and *E. Concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10: 2187–2198.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.
- Smith SE, Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis, 2nd edn*. New York, NY, USA: Academic Press.
- Swofford DL. 2002. *PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Version 4.08b10 for Macintosh*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 2001. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 475–464.
- Templeton AR. 1998. Nested clade analyses of phylogenetic data: testing hypothesis about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7: 381–397.
- Templeton AR. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789–809.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767–782.
- Wörheide G, Hooper JN, Degnan MB. 2002. Phylogeography of western Pacific *Leucetta 'chagosensis'* (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for populations history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Molecular Ecology* 11: 1753–1768.
- Wright S. 1978. *Evolution and the genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among natural populations*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making **charitable trust** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at www.newphytologist.org
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *OnlineEarly* – the 2003 average submission to decision time was just 35 days. Online-only colour is **free**, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a **personal subscription** to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £108 in Europe/\$193 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website)
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (newphytol@lancaster.ac.uk; tel +44 1524 592918) or, for a local contact in North America, the USA Office (newphytol@ornl.gov; tel 865 576 5261)

2.2 Etude de la variabilité génétique de la truffe blanche du Piémont, *Tuber magnatum* Pico : exemple de la truffière naturelle de Montemagno (Asti, Italie)

Contrairement à *T. melanosporum*, nous n'avons pas étudié la diversité génétique de *T. magnatum* sur toute son aire de distribution, ceci à cause principalement des problèmes rencontrés pour avoir un bon échantillonnage. Nous nous sommes donc focalisés sur une truffière naturelle qui est étudiée au laboratoire du département de biologie végétale de l'université de Turin depuis 1997.

Pour cette analyse, nous disposons de 42 ascocarpes récoltés durant cinq saisons de 1997 à 2002. Afin d'avoir une première idée sur la structure génétique en dehors de la truffière, nous avons 20 ascocarpes récoltés dans le sud de l'Italie, le Piémont et en Croatie. Nous avons analysé par séquençage direct plusieurs régions génomiques : l'ITS, deux parties du gène de la β -tubuline et une région SCAR (A21inf). Concernant les échantillons de la truffière de Montemagno, seulement la région A21inf c'est montré polymorphe, avec deux haplotypes. Ils ont été retrouvés dès la première saison (1997) et durant les cinq autres. Leur distribution n'est pas aléatoire puisqu'ils sont toujours présents dans les mêmes zones de la truffière.

Ceci nous a permis de dire qu'il existe au moins deux génotypes dans cette truffière naturelle.

Concernant les échantillons provenant d'autres régions, nous avons trouvé un troisième haplotype pour la région A21inf parmi les truffes du sud de l'Italie. De plus, la distribution de ces trois haplotypes n'est pas homogène : l'haplotype 1 est majoritaire dans les échantillons du Piémont alors que le 2 l'est parmi ceux de la Croatie. De même, nous avons identifié trois haplotypes ITS, dont un majoritaire. Les deux autres étant limités à une seule région, l'haplotype 2 au Piémont et le 3 à la Croatie. En revanche la β -tubuline est monomorphe.

Même si notre échantillonnage ne nous permet pas de conclure réellement sur la structure génétique de cette truffe, la distribution des allèles de l'ITS et d'A21inf indique une différenciation génétique. Une analyse sur un plus ample échantillonnage permettrait d'avoir une idée plus précise de la structure génétique de *T. magnatum*.

L'analyse caryologique, présenté dans l'article qui suit, fait partie de la thèse de doctorat d'Alfredo Vizzini.

Tuber magnatum Pico, a species of limited geographical distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground

Antonietta Mello,^{1*†} Claude Murat,^{2,3†} Alfredo Vizzini,² Virgilio Gavazza⁴ and Paola Bonfante^{1,2}

¹Istituto per la Protezione delle Piante del CNR, Sezione di Torino, Torino, Italy.

²Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università di Torino, Viale Mattioli, 25, 10125-Torino, Italy.

³UMR INRA/UHP 1136 'Interactions Arbres/Micro-Organismes', Centre INRA de Nancy, F-54280 Champenoux, France.

⁴Quercus s.c.a.r.l., Via Umberto I, 124 Murisengo (AL), Italy.

Summary

The aim of this work was to clarify the genetic structure of the ectomycorrhizal fungus, *Tuber magnatum* Pico, in a natural truffle ground located in north Italy. Ascomata of this population of *T. magnatum* were collected over a period of up to 5 years. For comparative analysis, *T. magnatum* fruit bodies of different geographical origin were also considered. We used single locus markers, such as the variable region of ribosomal genes (ITS), the β -tubulin gene and sequence-characterized amplified regions (SCAR), as tools to identify single-nucleotide polymorphisms (SNPs). On the basis of the molecular results, which were indirectly supported by a karyological analysis, a self-fertilization mechanism is suggested. A SCAR region was polymorphic within the samples of the truffle ground, leading to the identification of two genotypes. In addition, both the SCAR and the ITS proved to be polymorphic among samples coming from different geographical regions, revealing a genetic differentiation in *T. magnatum*.

Introduction

Ectomycorrhizal (ECM) fungi are known to act as crucial biological determinants of temperate and boreal forest ecosystems by improving the mineral nutrition of their host

plants (Smith and Read, 1997). In addition to this widely acknowledged role, some ECM fungi produce edible fruit bodies, which are a product in great demand on the food market in many countries. Among them, *Tuber magnatum* Pico, commonly known as the white truffle of Alba (<http://www.truffle.org>), is of special interest. It belongs to the order Pezizales and hence is one of the few ectomycorrhizal Ascomycetes. However, unlike *Tuber maculatum* Vittad., which is ubiquitous, or *T. borchii* Vittad., which is found throughout Europe (Mello *et al.*, 2000), *T. magnatum* fruit bodies have so far been collected in Italy, Croatia, Slovenia and Hungary, showing a narrow distribution range. Their unique taste and fragrance, as well as their limited availability, make *T. magnatum* fruit bodies one of the most expensive delicacies on the market (sold at 300–400 euros per 100 g during the 2003–04 season), a fact that led Pöggeler (2001) to call them 'vegetable gold'.

Although many studies on the molecular structure of ECM fungal populations have been published (Bonello *et al.*, 1998; Gherbi *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Fiore-Donno and Martin, 2001; Redecker *et al.*, 2001; Bergemann and Miller, 2002; Jany *et al.*, 2002), few studies have focused on the genetic variability of truffle populations (Guillemaud *et al.*, 1996; Bertault *et al.*, 1998; 2001; Mello *et al.*, 2002; Murat *et al.*, 2004). In particular, Guillemaud and colleagues (1996) found, using polymerase chain reaction (PCR) coupled with restriction fragment length polymorphism (RFLP), intraspecific polymorphism in the variable region of ribosomal genes (ITS) of six natural French populations of *Tuber aestivum*. They also showed that the genetic variation among individuals is sufficient to distinguish genotypes within a 'brûlé'. Consistent variability was found by Mello and colleagues (2002) in the ITS of a population of *Tuber uncinatum* in a natural truffle ground. On the basis of rapid amplification of polymorphic DNA (RAPD) and microsatellite analyses, Bertault and colleagues (1998; 2001) found a very low level of genetic diversity for *Tuber melanosporum*. They did not find isolation by distance in the larger scale of the European range and suggested a glaciation impact on genetic variation followed by rapid post-glaciation expansion. Murat and colleagues (2004) confirmed the low level of polymorphism of this species: the sequencing of 50 kbp of PCR-amplified sequence-charac-

Received 10 April, 2004; revised 25 May, 2004; accepted 25 May, 2004. *For correspondence. E-mail a.mello@ipp.cnr.it; Tel. (+39) 0116 502927; Fax (+39) 0116 705962. †These authors contributed equally to this work.

terized amplified region (SCAR) fragments from a representative set of fruit bodies did not show any variability. However, the ITS sequencing allowed them to discover genetic differentiation between regional populations of *T. melanosporum*. They hypothesized an old past fragmentation into two groups of populations, which probably colonized regions on different sides of the French Central Massif after the last glaciation period.

Data currently available on *T. magnatum* genetic variability are very limited: they rely on RAPD (Gandebouef *et al.*, 1997) and ITS-RFLP (Mello *et al.*, 2001). Both analyses were performed on a few samples (eight and 17 respectively) harvested in several Italian regions and revealed no genetic diversity. The study of the ITS was principally aimed at designing primers specific to *T. magnatum* to distinguish this species from other *Tuber* species, especially at the mycorrhizal level (Amicucci *et al.*, 1998; Mello *et al.*, 1999). A study on isozyme variability made on 13 Italian populations of *T. magnatum* (Frizzi *et al.*, 2001) revealed three alleles at two of the 11 enzymes investigated. Alleles were distributed among the different Italian populations, without an interpretable evolutionary occurrence correlated with geological or climatic phenomena (Frizzi *et al.*, 2001). More recently, a paper described the isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite loci in the white truffle (Rubini *et al.*, 2004). In all these studies realized on *T. aestivum*, *T. uncinatum*, *T. melanosporum* and *T. magnatum*, heterozygosity was never found, and this led the authors to hypothesize self-reproduction for these truffle species (Bertault *et al.*, 1998; 2001; Frizzi *et al.*, 2001; Murat *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2004). However, questions concerning the temporal and spatial structure of *T. magnatum* populations are still open.

A population analysis (irrespective of how a population is defined) deals, among other aspects, with the identification of individuals. As illustrated in many papers dealing with population genetics of fungi (Bonello *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999; 2000; Redecker *et al.*, 2001), the key solution to the identification of fungal individuals is to recognize the mycelial clone, the so-called genet. The successful strategy for distinguishing genets in ECM fungi is to sample fruit bodies within an area and to look for genetic variability among them. Once genets have been determined, they can differ in the extent of the mycelial phase and their life span.

In order to tackle these questions, our specific objective was to start unravelling the genetic diversity of a *T. magnatum* population. *T. magnatum* fruit bodies were collected in a natural truffle ground for as long as 5 years. For comparative analysis, *T. magnatum* fruit bodies from different geographical origins were also considered. We used single locus markers such as ITS, the functional β -tubulin gene and SCAR to look for single-nucleotide poly-

morphisms (SNPs). Although ITS and the β -tubulin sequences are usually known to be highly conserved at the intraspecies level in fungi, there is evidence that these markers are polymorphic in some species (Guillemaud *et al.*, 1996; Glen *et al.*, 2001; Johannesson *et al.*, 2001; Jany *et al.*, 2002; Mello *et al.*, 2002; Murat *et al.*, 2004). With the long-term aim of correlating the genetic status of truffles (potentially self-fertile organisms) with the crucial events of their life cycle (meiosis and mitosis during spore formation), a karyological analysis was performed, and the nuclear status of the spores, at different developmental steps, was investigated.

Even if the sampling was obviously limited by the high economic value of truffles, our analysis allowed us to demonstrate a local and global genetic diversity in *T. magnatum*: (i) two haplotypes were present in the truffle ground; and (ii) additional haplotypes were present on different sampling scales.

Results

In order to clarify the local genetic variability of the white truffle, *T. magnatum*, 42 fruit bodies were harvested in a natural truffle ground, located at Montemagno, during the winters of 1997–2002 (Table 1). These fruit bodies were found exclusively under specific trees of *Quercus robur* and *Populus nigra*, leading to the identification of productive and not productive areas (Fig. 1).

The genetic variability of the white truffle population was assessed with different single locus markers. As a first step, the variable region of ribosomal genes (ITS) and the gene for β -tubulin were analysed.

ITS and β -tubulin

As ITS sequences are polymorphic in some species, including *Tuber* species, and given that only four ITS sequences from *T. magnatum* were present in GenBank at the start of our investigation, ITS regions were sequenced as a first step.

ITS from the 42 *T. magnatum* fruit bodies collected in the Montemagno truffle ground was amplified, producing a band of 640 bp, and sequenced with primers ITS1 and ITS4 (except those from A8, A12 and A24 on account of manipulation problems). Alignment of the sequences did not show any polymorphism (the accession numbers are listed in Table 1). For comparison, we also amplified and sequenced the ITS from the 20 *T. magnatum* fruit bodies coming from outside the truffle ground (the accession numbers listed in Table 1). Two SNPs were found: one in sample B6, coming from Piedmont; and the other one in GO2, IS1 and IS2, coming from Croatia. The two SNPs generated three haplotypes: haplotype 1, the most common one; haplotype 2, corresponding to B6; and haplo-

Table 1. Fruit bodies of *T. magnatum* collected since 1997, the nearest host species, accession numbers of the sequences from the genomic regions analysed and the associated haplotypes.

Sample name	Nearest host species	ITS		β -tub1	β -tub2	A21inf	
		Acc. no.	Haplotype	Acc. no.	Acc. no.	Acc. no.	Haplotype
Season 1997–98							
A2	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586307	1	AJ586417	AJ586424	AJ578828	II
A3	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586306	1	AJ586418	AJ586425	AJ578829	II
A8	<i>Quercus robur</i> L.					AJ578830	I
A12	<i>Quercus robur</i> L.					AJ578831	II
A21	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586305	1			AJ578832	I
A22	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586304	1			AJ578833	II
A23	<i>Populus tremula</i> L.	AJ586303	1			AJ578834	II
A24	<i>Quercus robur</i> L.					AJ578835	I
A27	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586302	1			AJ578836	I
A29	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586301	1			AJ578839	I
A30	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586300	1			AJ578838	I
A31	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586299	1			"	I
A34	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586298	1			AJ578882	II
A35	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586297	1			AJ578840	II
A37	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586296	1			AJ578841	II
Season 1998–99							
C1	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586295	1			AJ578842	I
C2	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586294	1	AJ586419	AJ586426	AJ578843	I
C3	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586293	1			AJ578844	II
C5	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586292	1			AJ578845	II
C7	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586291	1			AJ578846	I
C8	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586290	1			AJ578847	II
C9	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586289	1			AJ578848	I
C10	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586288	1			AJ578849	II
C11	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586287	1			AJ578850	I
C12	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586286	1	AJ586420	AJ586427	AJ578851	II
C13	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586285	1			AJ578852	I
C14	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586284	1			AJ578853	II
C15	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586283	1			AJ578854	II
C16	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586282	1			AJ578855	II
C17	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586281	1			AJ578856	II
Season 1999–2000							
Tm1	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586280	1	AJ579836	AJ579845	AJ578857	I
Tm2	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586279	1			AJ578858	II
Tm3	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586278	1			AJ578859	I
Tm4	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586308	1			AJ578860	II
Season 2000–01							
D1	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586277	1	AJ579837	AJ579846	AJ578861	I
Season 2001–02							
F1	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586276	1			"	I
F2	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586275	1			AJ578862	I
F3	<i>Populus nigra</i> L.	AJ586274	1			AJ578863	I
F6	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586273	1			AJ578864	I
F7	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586272	1			"	II
F8	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586270	1			AJ578865	I
F9	<i>Quercus robur</i> L.	AJ586269	1			AJ578866	I

Sample name	Collection site	ITS		β -tub1	β -tub2	A21inf	
		Acc. No.	Haplotype	Acc. no.	Acc. no.	Acc. no.	Haplotype
Samples from Piedmont (north Italy)							
B1	San Desiderio (AT)	AJ586268	1	AJ579834	AJ579843	"	I
B2	Zanco (AT)	AJ586267	1			AJ578869	I
B3	Ponzano (AC)	AJ586266	1			AJ578870	I
B6	San Desiderio (AT)	AJ586271	2	AJ586421	AJ586428	AJ578868	I
B8	Castellalfero (AT)	AJ586265	1			AJ578871	II
B9	Castellalfero (AT)	AJ586264	1			AJ578872	I
B19	Montemagno (AT)	AJ586263	1			AJ578867	I
B11	Montemagno (AT)	AJ586262	1			AJ578873	II
E1	Montemagno (AT)	AJ586261	1	AJ579835	AJ579844	AJ578874	I
b2	Unknown	AJ586260	1	AJ579833	AJ579842	AJ578875	I
b4	Unknown	AJ586259	1			AJ578876	I

Table 1. cont.

Sample name	Collection site	ITS		β -tub1	β -tub2	A21inf	
		Acc. No.	Haplotype	Acc. no.	Acc. no.	Acc. no.	Haplotype
Samples from Campania and Molise (south Italy)							
Tm sal	Salerno	AJ605110	1	AJ579838		AJ578877	I
XL	Campobasso	AJ586258	1		AJ579848	AJ578837	III
Y	Campobasso	AJ586257	1	AJ579839	AJ579849	AJ578878	II
Z	Campobasso	AJ586256	1	AJ579841	AJ579847	AJ578879	III
Samples from Croatia (Istria)							
IS1	Motovun	AJ586252	3			AJ605111	I
IS2	Motovun	AJ586253	3			AJ605112	II
IS3	Motovun	AJ586254	1			AJ605113	II
GO1	Motovun-Montona	AJ586255	1	AJ586422	AJ586429	AJ578880	II
GO2	Motovun-Montona	AJ586251	3	AJ586423	AJ586430	AJ578881	II

a. A sequence not provided, in which only the kind of haplotype could be well identified.

type 3, corresponding to GO2, IS1 and IS2 (Table 1). The similarity percentage was calculated in order to compare *T. magnatum* ITS with that of other fungal species: a similarity of 99.61% (507 conserved positions out of 509 alignment length) was found within the 59 *T. magnatum* fruit bodies analysed.

Primer sets, designed by Glass and Donaldson (1995) to amplify the gene for β -tubulin, revealed the presence of

introns in *Neurospora crassa*. As introns are likely to be polymorphic, these primers were used to look for variability in *T. magnatum*.

The gene for β -tubulin, from six *T. magnatum* fruit bodies sampled in the truffle ground and nine fruit bodies of different geographical origins, was amplified with the primer sets Bt1a/Bt1b and Bt2a/Bt2b. The amplification products were 537 bp long with Bt1a/Bt1b and 495 bp

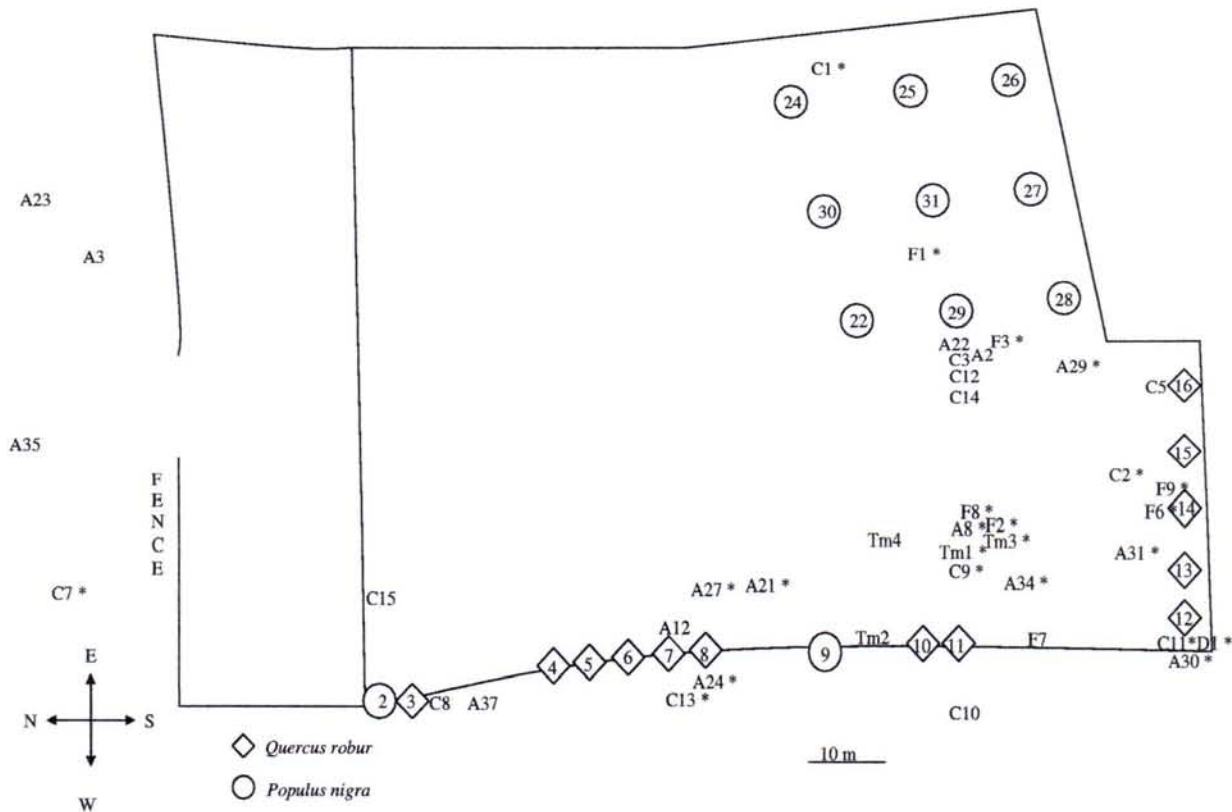


Fig. 1. Map of the truffle ground located at Montemagno (AT). Fruit bodies of *T. magnatum* are represented by letters and numbers. Letters A, C, Tm, D and F indicate fruit bodies harvested during the seasons 1997–98, 1998–99, 1999–2000, 2000–01 and 2001–02 respectively. Samples A23, A3, A35 and C7 are included in the analysis of the truffle ground because of their proximity to it and the absence of any barrier. The presence and the absence of the star indicate, respectively, the haplotypes I and II revealed by the A21inf sequencing of *T. magnatum*.

Table 2. Primer pair designed on the investigated locus and size of the amplified product.

Locus	Primer name	Sequence 5' → 3'	Size of PCR product (bp)
SCAR A21-inf	CL1	CTTGAGCAAACCTCCAATAGAG	572
	CL2	GACACGATCCAAGTCGAGAG	

long with Bt2a/Bt2b. The sequences of the products obtained showed no polymorphism, although there was one intron in the region amplified by the Bt1 primers and three introns in that amplified by the Bt2 primers (accession numbers in Table 1).

This first set of experiments, covering samples collected during all five winters, demonstrates that ITS, as well as a functional gene such as β -tubulin, do not reveal any polymorphism in the samples of the truffle ground, whereas two SNPs at the ITS are revealed in the samples coming from outside.

SCAR characterization and SNP identification

One polymorphic RAPD fragment obtained with the primer OPA-7 from the fruit bodies collected in the truffle ground during the first 2 years was chosen for fine analysis on the 62 *T. magnatum* fruit bodies. It was cloned and sequenced, producing a SCAR named A21-inf. This sequence showed no significant similarity to known sequences in GenBank. In order to amplify and sequence the anonymous region from all the samples and to search for polymorphism, the primer pair CL1/CL2 was designed.

Amplification of the SCAR with CL1/CL2 produced a band of the expected size (Table 2) for the 42 samples from the truffle ground and the 20 of different origins (data not shown). The PCR products from SCAR A21-inf were successfully sequenced from all 62 fruit bodies. The alignment of the sequences from SCAR A21-inf showed two SNPs, which generated three haplotypes (Table 1, Fig. 2). Haplotypes I and II were distributed in the truffle ground and among the other samples, irrespective of their geographical origins (Table 1). In contrast, haplotype III was only found in two samples from south Italy (Table 1).

As it is assumed that the direct sequencing of PCR products allows the identification of the heterozygote (Johannesson *et al.*, 2002; Selosse *et al.*, 2002), the chromatograms of the sequences were also carefully inspected from this point of view. Double peaks were never found, suggesting that heterozygosity is not present.

Karyological analysis

In order to correlate the genetic status of the truffles with the crucial events in their life cycle (meiosis and mitosis

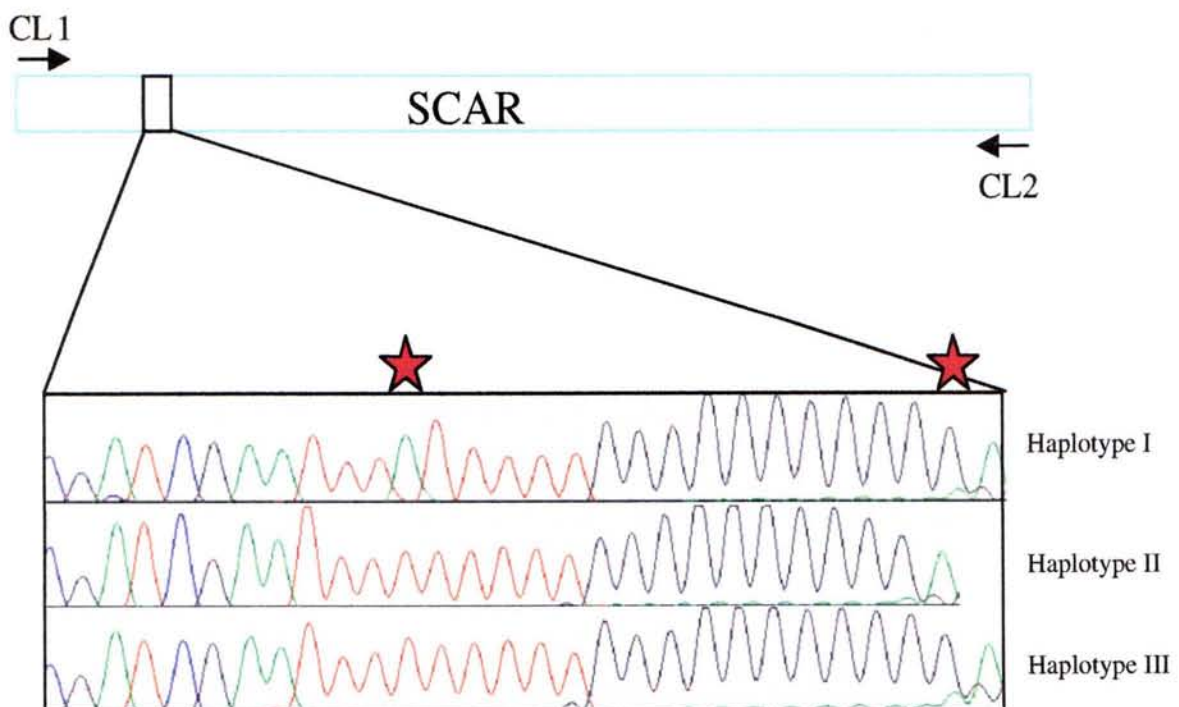


Fig. 2. Two SNPs, indicated by a star, in SCAR A21-inf, originating the haplotypes I, II and III.

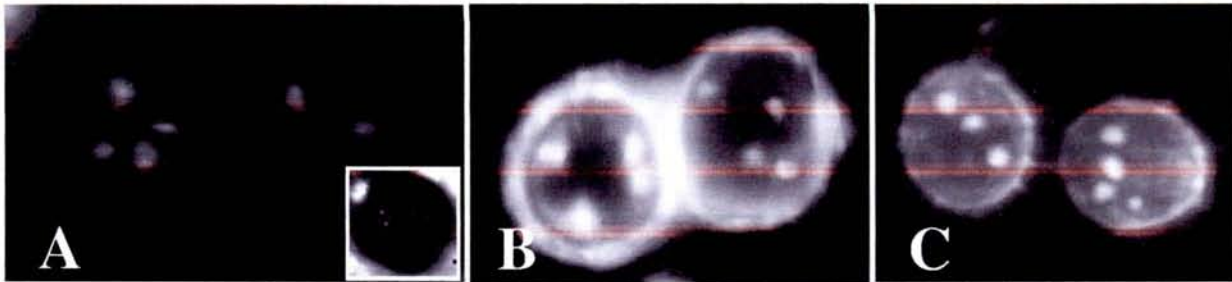


Fig. 3. *T. magnatum* immature (A) and mature (B and C) ascospores after DAPI staining (900× magnification). The small bordered picture in (A) shows the whole ascus. In (C), the fourth nucleus in the left ascospore is not in focus.

during spore formation), the number of nuclei within the spores was counted. *T. magnatum* fruit body slices were incubated with the fluorochrome DAPI and observed under an epifluorescence microscope. Young and mature asci usually contain two or three ascospores. A total of 120 ascospores from four fruit bodies was observed. Developing ascospores quickly achieve a tetranuclear condition in most of the observed samples (Fig. 3A). Ripened ascospores (with clear ornamentations and pigmented cell walls) contained four nuclei in 63.3% of cases (Fig. 3B and C).

Discussion

Notwithstanding the drawback of having a limited number of sampled fruit bodies (42: about 60% of the whole production in the first 2 years, plus about 10% in the following years), our investigation allowed us, for the first time, to define some genetic features of a *T. magnatum* population living in a natural truffle ground. Analysis of ITS, β -tubulin and SCAR-A21inf, 640 bp, 1032 bp and 572 bp long, respectively, showed a very low genetic diversity: only two SNPs out of 2244 bp (i.e. 0.089%). The two SNPs found in SCAR-A21inf revealed the presence of two haplotypes in the Montemagno truffle ground. The identification of fungal individuals is a principal goal of population genetics. Understanding whether fruit bodies of a truffle species, found in the same area, originate from a common mycelium or from different mycelia is a challenging objective. The key solution is to recognize the mycelial clone, the so-called genet. They are defined as repeatedly sampled multilocus genotypes, which are unlikely to arise by chance in sexual reproduction (Anderson and Kohn, 1995). Even if one of our first goals was to delineate genets, which is a difficult task in a low polymorphic species, the little allelic diversity found on a local scale did not allow us to reach this goal.

As the two haplotypes found in the truffle ground are based only on one polymorphic locus, the SCAR-A21inf, we consider the two distinguished units as genotypes rather than genets.

Diversity within and outside the truffle ground

The SNPs can be broadly defined as any single base substitution/indel in the genome of an individual (Brookes, 1999). They are used as a powerful marker for mutational analysis in humans and are normally found in non-coding regions subject to less selection. They have been found in man, in passerine birds and in maize, as an average of one SNP every 100–300 bp, 150–175 bp and 27.6 bp respectively (Tenaillon *et al.*, 2001; Primmer *et al.*, 2002). Their presence in the ITS of *T. melanosporum* has allowed the identification of a genetic differentiation that reflects a regional distribution of this fungus (Murat *et al.*, 2004). *T. magnatum* ITS sequences obtained from the truffle-ground samples did not reveal any polymorphism. This result confirms the absence of polymorphism in the four ITS sequences that were present in the GenBank at the beginning of our investigation. However, the finding of two SNPs in samples outside the truffle ground revealed three alleles out of a total of 59 fruit bodies. It seems that one allele is dominant and that the other two are rare. However, because of the small number of *T. magnatum* samples investigated, the allele frequency cannot be indicated exactly without making mistakes. Of the 509 aligned positions, only two positions (0.39%) displayed SNP. In the case of *T. melanosporum*, Murat and colleagues (2004) identified 10 alleles out of a total of 188 fruit bodies. Two out of the 10 alleles were dominant, i.e. present in all the regionally sampled populations, a third allele was limited to some populations, and all the others were exclusive to single populations. Of the 539 aligned positions, only nine positions (1.67%) displayed SNP.

Mello and colleagues (2002) found 11 alleles in 12 fruit bodies of *T. uncinatum*, mostly coming from the same area. Unlike *T. magnatum* and *T. melanosporum*, of the 640 aligned positions of *T. uncinatum*, 38 (6%) displayed SNP or polymorphic insertion/deletion events (indels).

Regarding other species within the genus *Tuber*, data from the ITS sequences of *T. indicum* indicate a very high variability (13.10%) (Mabru *et al.*, 2001) that could change as soon as phylogenetic investigations for other Asian truffles, close to *T. indicum*, clarify the taxonomic position

of these truffles. From these comparisons, *T. magnatum* ITS shows a very low variability, similar to that of *T. melanosporum* ITS, whereas *T. uncinatum* and *T. indicum* ITS are more polymorphic. Several ITS-RFLP genotypes of *Cenococcum geophilum* co-exist within the same limited soil, suggesting that *C. geophilum* does not fit the model of low-numbered and exclusive genotypes that one would expect for an ECM fungus that lacks meiospore production (Jany *et al.*, 2002). The population structure of *Schizophyllum commune* has been addressed by studying the phylogeny and evolutionary dynamics of ITS and IGS1 (Timothy *et al.*, 2001). Of the 27 sequences obtained for ITS, only 31 positions (5%) were variable. In contrast, of the 195 strains sampled for IGS1, 172 (33.9%) displayed variability. Although ITS possessed less sequence variation than IGS1, phylogenetic analysis of the ITS recovered the same three evolutionarily distinct lineages within the *S. commune* global population. Therefore, ITS sequences have been applied in studying the population structure whereas, generally, ITS sequences are used to delineate relationships among fungal species within genera (e.g. Yan *et al.*, 1995; Aanen *et al.*, 2000; Høiland and Holst-Jensen, 2000), including the genus *Tuber* (Mabru *et al.*, 2001; Mello *et al.*, 2002).

Concerning the genetic variability within some *Tuber* species investigated by RAPD, Gandeboeuf and colleagues (1997) found that *T. magnatum* and *T. melanosporum* groups presented the strongest intraspecific homogeneity, with Jaccard genetic similarity indices of 1 and 0.80 respectively. For the other species such as *T. borchii*, *T. rufum*, *T. macrosporum*, *T. mesentericum* and *T. excavatum*, the genetic similarity index was very low (0.10–0.20).

The β -tubulin fragments, obtained with two different primer sets, were not polymorphic in *T. magnatum*, thus revealing that the two regions that we amplified are not a good molecular marker for studying the population genetics of this fungus. In contrast, in *Daldinia loculata*, the β -tubulin locus, amplified by the primer set bt1a/bt1b, presents multiple deletions and insertions in the intron sequence, thus being capable with other markers of revealing a genetic differentiation in Eurasian populations of this post-fire ascomycete (Johannesson *et al.*, 2001).

SCAR markers have already been used in fungi for population analysis. Within *Magnaporthe grisea* populations, they have been used as markers to monitor recombination and migration (Soubabere *et al.*, 2001) whereas, among populations of *T. melanosporum*, five SCAR markers did not reveal any polymorphism (Murat *et al.*, 2004).

In our investigation, a SCAR marker let us identify two truffle haplotypes in the truffle ground. They were always detected over several years: in the first sampling year and then for the next 5 years, except in the fourth year (Table 1 and Fig. 1). That year was characterized by dry weather

in August and September, by freezing temperatures at the beginning of winter and by a very limited sampling: only one fruit body. Although only 1/10th of the fruit bodies produced in the truffle ground have been collected in the last 3 years, we found that each genotype occurred in the following seasons, often in the same zone of the truffle ground and always not far from the trees (Fig. 1).

Finally, the recent paper by Rubini and colleagues (2004) described eight polymorphic microsatellite loci in *T. magnatum*. The availability of such markers will be helpful in the assessment of the genetic structure and population dynamics of the white truffle.

An important outcome

Our investigation on the *T. magnatum* samples of different geographical origins has revealed that two genomic regions present additional alleles outside the selected truffle ground. A third allele at A21inf is present only in two samples from Campobasso, south Italy, while a second allele at the ITS region is present in one sample from Piedmont and a third in three Croatian samples (Table 1). This is the first time that molecular analysis has revealed genetic variability in *T. magnatum*, either within a population or among samples of different geographical origins. Furthermore, Frizzi and colleagues (2001) found, by isozyme analysis of populations of *T. magnatum*, three electrophoretic types in Campobasso, instead of the two commonly present in most Italian locations. Although our first aim was to study the genetic variability of a specific *T. magnatum* population, our results led us to hypothesize a genetic differentiation in *T. magnatum* over its habitat (Italy and Croatia), as observed recently in *T. melanosporum* (Murat *et al.*, 2004). This finding could have important consequences when the geographical origin of *T. magnatum* is required.

In conclusion, our long-term analysis has demonstrated that a natural truffle ground, productive since at least 1850, presents two *T. magnatum* genotypes. They do not seem to intermingle, suggesting that a self-fertilization mechanism may operate, given that environmental conditions are unchanged.

The discovery of additional polymorphic markers for *T. magnatum* will be a very useful tool for investigating *T. magnatum* genets and their temporal and spatial distribution within the Montemagno truffle ground.

Pseudohomothallism versus heterothallism: still an open question

It is generally assumed and convincingly illustrated by the paper of Guidot and colleagues (2002) that sexual reproduction must be a rather rare event when small genets are absent. Although our analysis does not identify genets, our finding of only two genotypes in an area of 7000 m²

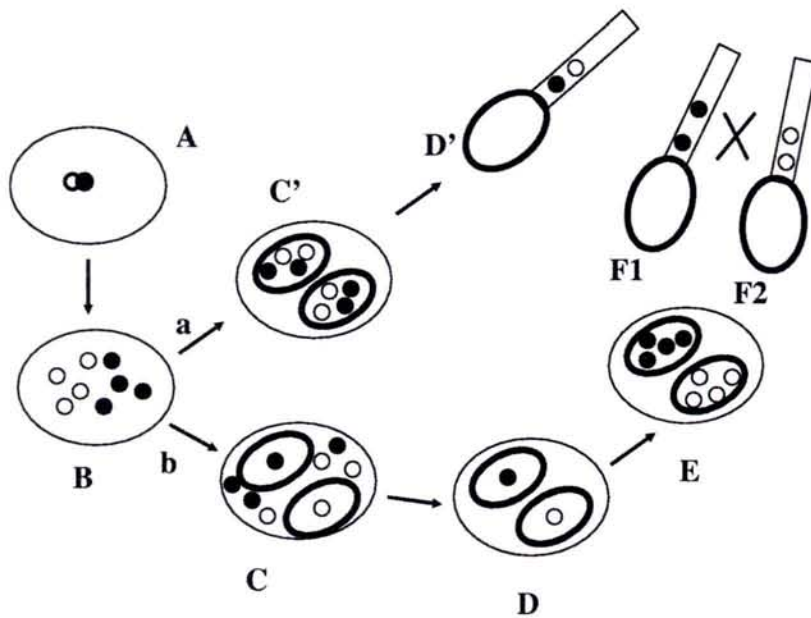


Fig. 4. Two possible mechanisms to explain the condition of plurinuclearity observed in *T. magnatum*.

A. Fusion of nuclei of opposite sexuality in the ascus.
 B. Nuclei derived from meiosis and mitosis.
 C. Formation of ascospores around a single nucleus.
 D. The nuclei left in the ascus degenerate.
 E. Mitotic divisions. (a) All the nuclei derived from mitosis are compartmentalized (A, B, C'). (b) Compartmentalization around a single nucleus that then undergoes mitotic divisions (A, B, C, D, E). D', F1 and F2, germinating ascospores and incipient promycelia.

may suggest self-reproduction, as already hypothesized by Frizzi and colleagues (2001). The absence of heterozygosity in SCAR-A21inf, as well as in eight polymorphic microsatellite loci (Rubini *et al.*, 2004), reinforces our suggestion, even if such an absence does not prove in itself that *T. magnatum* is not heterothallic in the absence of an experimental system to perform crossings.

Within Ascomycetous fungi, sexually reproducing species usually follow one of the three basic sexual reproductive strategies: homothallism, pseudohomothallism (secondary homothallism) and heterothallism (Nelson, 1996; Pöggeler, 2001). Individual haploid mycelia of homothallic and pseudohomothallic (haploid but heterokaryotic) fungi are self-fertile (Pöggeler, 2001). In a young ascus, two haploid nuclei fuse to form a diploid nucleus that quickly undergoes meiosis giving four nuclei, generally followed by mitosis with the production of eight nuclei. Around each nucleus, the haploid sexual progeny, the ascospore, is produced. The eight ascospores are then discharged from the fruiting bodies formed by most filamentous Ascomycetes.

Tuber species have plurinucleated ascospores (Donadini, 1987; Vizzini, 2001). According to our observations, each of the two or three spores of *T. magnatum* usually has four nuclei, revealing the expected condition of plurinuclearity (Fig. 3). In the case in which two spores are produced (this was the most common condition in our observation), two possible mechanisms may lead to this condition (Fig. 4). In the first one, the eight nuclei that derive from meiosis and one mitotic event inside the ascus are compartmentalized to give rise to two ascospores (A, B, C'). In the second situation, ascospore formation could

occur around a single nucleus that then undergoes further mitotic divisions (A, B, C, D, E). In this case, the nuclei that remain free outside the ascospore degenerate. The nuclei inside the ascus can be of identical or opposite sexuality. In the former situation, the nuclei give rise to a self-fertile mycelium (homothallism). Whether nuclei of opposite sexuality are present in the ascus or not, two final situations can be envisaged: (i) given that nuclei of opposite sexuality are both present in the ascospores, they give rise to a self-fertile mycelium (pseudohomothallism); (ii) given that nuclei of opposite sexuality are present in separate ascospores, they give rise to a self-sterile mycelium (heterothallism). To the best of our knowledge, mating type genes, which determine heterothallism and pseudohomothallism, have never been reported for truffles, unlike for other filamentous Ascomycetes, such as *N. crassa* (Glass *et al.*, 1990; Staben and Yanofsky, 1990; Ferreira *et al.*, 1996) and *Podospora anserina* (Debuchy and Coppin, 1992; Debuchy *et al.*, 1993). Our hypotheses therefore cannot be verified experimentally. Moreover, a further limiting step results from the absence of an experimental system based on spore germination and therefore of the classical breeding of the resulting mycelia. However, the dominant presence of two ascospores per ascus, each containing four nuclei, and the apparent absence of degenerating nuclei free in the asci (Fig. 3) suggest that the first hypothesis is more probable.

In conclusion, taken together, the experimental results from our molecular analysis and the hypotheses drawn on karyological observations tend to exclude heterothallism in favour of self-fertilization. Self-fertilization can explain

the low genetic variability of *T. magnatum*, which was probably affected by glaciation, as Bertault and colleagues (1998; 2001) have already suggested for *T. melanosporum*.

Experimental procedures

Identification of the truffle ground, geographical data

The truffle ground, of about 7.000 m², is situated in a valley at Montemagno (Asti, Piedmont, north Italy, 8°19' 35" 4 E, 44°59' 2" 40 N). It is characterized by the persistence of a moist soil, even in the hot season. The area is particularly useful for research studies because it does not present signs of anthropic activities, with the exception of the enlargement of a natural stream and the seasonal mowing. In this truffle ground, there are some trees that are 50 years old, although most are younger. The following tree species are present: *Populus nigra* L., *P. alba*, *P. tremula* L., *Quercus robur* L., *Salix alba* L. and *Tilia cordata* Miller. Records on productivity claim that this truffle ground has produced truffles since at least 1850. Trees usually start to produce, depending on their age and species, when they are 10–20 years old. Figure 1 only shows trees at least 10–15 years old and therefore expected to be productive.

To clarify the local genetic variability and the dynamics of the white truffle, *T. magnatum*, 42 fruit bodies were harvested during the winters of 1997–2002 (Table 1). The agreement with the owner of the truffle ground allowed us to collect in the first 2 years about 60% and in the following years 10% of the whole *T. magnatum* fruit bodies produced. Their sampling position was mapped with respect to the nearest tree (Fig. 1). In order to perform a comparative analysis of the observed genetic diversity, additional fruit bodies of *T. magnatum* were investigated: 11 were collected from Piedmont (north Italy), four from Campania and Molise (south Italy) and five from Croatia (Table 1). All 62 fruit bodies were then analysed.

Sampling and DNA extraction

A total of 62 fruit bodies of *T. magnatum* of different geographical origins were considered for DNA analysis (Table 1). Each fruit body was washed and the peridium peeled. The gleba was cut into small pieces and stored at –80°C. Total DNA was extracted using the Dneasy plant mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

DNA amplification and data analysis

ITS from 62 *T. magnatum* fruit bodies was amplified with primers ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) according to the protocol described by Mello and colleagues (1996). The PCR products from all the samples were sequenced, except those from A8, A12 and A24 because of problems with manipulations (accession numbers are listed in Table 1).

Two primer sets, Bt1a/Bt1b and Bt2a/Bt2b, constructed from the *N. crassa* β -tubulin gene (Glass and Donaldson, 1995), were used for DNA amplification from six *T. magnatum* fruit bodies sampled in the truffle ground and from nine of different geographical origins. The PCR products were sequenced, and the accession numbers are listed in Table 1.

RAPD amplifications were carried out with primer OPA-7

(Operon Technologies), according to the method of Lanfranco and colleagues (1998), for some samples collected in the truffle ground in the first 2 years. One polymorphic RAPD band was converted into SCAR and used to look for SNPs.

A 694 bp band from fruit body A21, named A21-inf, was isolated from agarose gel with a Qiaex II gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The band was cloned into the plasmid pGEM-T system I vector (Promega) and transformed in the ultracompetent cells *Escherichia coli* XL-2 according to the manufacturer's instructions. Inserts were amplified with universal primers SP6 and T7 and sequenced by Genome Express. The primer pair C11/CL2 was designed by AMPLIFY version 1.2 to amplify A21-inf from all the samples (Table 2). Amplification conditions with these primers were identical to ITS amplifications except for the annealing temperature, which was set at 55°C. PCR-amplified SCARs were purified with a PCR purification kit (Qiagen) and sequenced (accession numbers are listed in Table 1).

Sequencing was done for all the loci analysed, except when indicated otherwise, by GeneLab. Significant alignment of the SCAR was searched in GenBank using BLASTN and BLASTX on the NCBI website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> (Altschul *et al.*, 1997).

The sequences obtained from all ascocarps were verified visually on the chromatograms using SEQUENCHER 3.1.1 (GeneCodes). SNPs were detected by sequence multialignment using the 'assembly contig' of routine SEQUENCHER 3.1.1. Similarity of the ITS sequences was calculated with CLUSTAL W multiple alignment (at <http://www.npsa-pbil.ibcp.fr/>).

Karyological analysis

In order to observe nuclei within the spores, the fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in Tris buffer at a final saturating concentration of 5.6 μ M was used. This stain specifically binds AT-rich, double-stranded DNA. Hand-made sections of the inner fertile portion of four *T. magnatum* fruit bodies were incubated in DAPI for 15 min and observed directly under an epifluorescence Zeiss microscope.

Acknowledgements

We wish to thank Franco Ferraris, the owner of the truffle ground at Montemagno (AT), and all the people who kindly provided the samples analysed. We are grateful to Dr Stefano Ghignone, Dr Laura Miozzi and Elisabetta Pecorella for helping us in the preparation of samples for sequencing, and Dr Francis Martin for critical reading of the manuscript. The research was funded by the National Council of Research in Italy, Strategic Program 'Biotecnologia dei funghi eduli ectomicorrizici: dalle applicazioni agro-forestali a quelle agro-alimentari', by CRT Foundation (Cuneo, Italy) and CEBIOVEM (DM 17/10/2003, n 193/2003). This project has benefited from a PhD fellowship from the Italian ISASUT (University of Torino) to Claude Murat.

References

Aanen, D.K., Kuyper, T.W., Boekhout, T., and Hoekstra, R.F. (2000) Phylogenetic relationships in the genus *Hebeloma*

- based on ITS 1 and 2 sequences, with special emphasis on the *Hebeloma crustuliniforme* complex. *Mycologia* **92**: 269–281.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Amicucci, A., Zambonelli, A., Giomaro, G., Potenza, L., and Stocchi, V. (1998) Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Mol Ecol* **7**: 273–277.
- Anderson, J.B., and Kohn, L.M. (1995) Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 369–391.
- Bergemann, S.E., and Miller, S.L. (2002) The size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phytol* **156**: 313–320.
- Bertault, G., Raymond, M., Berthomieu, A., Callot, G., and Fernandez, D. (1998) Trifling variation in truffles. *Nature* **394**: 734.
- Bertault, G., Rousset, F., Fernandez, D., Berthomieu, A., Hochberg, M.E., Callots, G., and Raymond, M. (2001) Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* **86**: 451–458.
- Bonello, P., Bruns, T.D., and Gardes, M. (1998) Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytol* **138**: 533–542.
- Brookes, A. (1999) The essence of SNPs. *Gene* **234**: 177–186.
- Debuchy, R., and Coppin, E. (1992) The mating types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of fertilization domains. *Mol Gen Genet* **233**: 133–121.
- Debuchy, R., Arnaise, S., and Lecellier, G. (1993) The *mat* allele of *Podospora anserina* contains three regulatory genes required for the development of fertilized female organs. *Mol Gen Genet* **241**: 667–673.
- Donadini, J.C. (1987) Pezizales et Tuberales (2). Le genre *Tuber* (*T. borchii* Vitt. et *T. puberulum* Berk and Broome). Cytologie des spores, paraphyses et poils par coloration microscopie électronique (*Tuber melanosporum*). *Doc Mycol* **18**: 47–60.
- Ferreira, A.V.B., Saube, S., and Glass, N.L. (1996) Transcriptional analysis of the *mt A* idiomorph of *Neurospora crassa* identifies two genes in addition to *mt A-1*. *Mol Gen Genet* **250**: 767–774.
- Fiore-Donno, A.M., and Martin, F. (2001) Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytol* **152**: 533–542.
- Frizzi, G., Lalli, G., Miranda, M., and Pacioni, G. (2001) Intraspecific isoenzyme variability in Italian population of the white truffle *Tuber magnatum*. *Mycol Res* **105**: 365–369.
- Gandebœuf, D., Dupré, C., Roehel-Drevet, P., Nicolas, P., and Chevalier, G. (1997) Grouping and identification of *Tuber* species using RAPD markers. *Can J Bot* **75**: 36–45.
- Gherbi, H., Delaruelle, C., Selosse, M.A., and Martin, F. (1999) High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Mol Ecol* **8**: 2003–2013.
- Glass, N.L., and Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1323–1330.
- Glass, N.L., Grotelueschen, J., and Metzner, R.L. (1990) *Neurospora crassa* A mating type region. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4912–4916.
- Glen, M., Tommerup, I.C., Bougher, N.L., and O'Brien, P.A. (2001) Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with *Eucalyptus* ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycol Res* **105**: 843–858.
- Guidot, A., Gryta, H., Gourbière, F., Debaud, J.C., and Marmeisse, R. (2002) Forest habitat characteristics affect balance between sexual reproduction and clonal propagation of the ectomycorrhizal mushroom *Hebeloma cylindrosporium*. *OIKOS* **99**: 25–36.
- Guillemaud, T., Raymond, M., Callot, G., Cleyet-Marel, J.C., and Fernandez, D. (1996) Variability of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA of a truffle species (*Tuber aestivum*). *Mycol Res* **100**: 547–550.
- Høiland, K., and Holst-Jensen, A. (2000) *Cortinarius* phylogeny and possible taxonomic implications of ITS rDNA sequences. *Mycologia* **92**: 694–710.
- Jany, J.L., Garbaye, J., and Martin, F. (2002) *Cenococcum geophilum* populations show a high degree of genetic diversity in beech forests. *New Phytol* **154**: 651–659.
- Johannesson, H., Vasiliauskas, R., Dahlberg, A., Penttilä, R., and Stenlid, J. (2001) Genetic differentiation in Eurasian populations of the postfire ascomycete *Daldinia loculata*. *Mol Ecol* **10**: 1665–1677.
- Johannesson, H., Ihrmark, K., and Stenlid, J. (2002) Differential decay extension capability of *Daldinia* spp. in wood of *Betula pendula*, *Alnus glutinosa* and *Fraxinus excelsior*. *For Ecol Manag* **167**: 295–302.
- Lanfranco, L., Perotto, S., and Bonfante, P. (1998) Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. In *Applications of PCR in Mycology*. Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., and Elander, R.P. (eds). CABI **6**: 107–124.
- Mabru, D., Dupré, C., Douet, J.P., Leroy, P., Ravel, C., Ricard, J.M., et al. (2001) Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* **11**: 89–94.
- Mello, A., Nosenzo, C., Meotto, F., and Bonfante, P. (1996) Rapid typing of truffle mycorrhizal roots by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycorrhiza* **6**: 417–421.
- Mello, A., Garnero, L., and Bonfante, P. (1999) Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. *New Phytol* **141**: 511–516.
- Mello, A., Vizzini, A., Longato, S., Rollo, F., Bonfante, P., and Trappe, J.M. (2000) *Tuber borchii* versus *T. maculatum*: neotype studies and DNA analyses. *Mycologia* **92**: 326–333.
- Mello, A., Fontana, A., Meotto, F., Comandini, O., and Bonfante, P. (2001) Molecular and morphological characterization of *T. magnatum* mycorrhizas in a long-term survey. *Microbiol Res* **155**: 279–284.
- Mello, A., Cantisani, A., Vizzini, A., and Bonfante, P. (2002)

- Genetic variation of *Tuber uncinatum* and its relatedness to other black truffles. *Environ Microbiol* **4**: 584–594.
- Murat, C., Diez, J., Luis, P., Delaruelle, C., Dupré, C., Chevalier, G., *et al.* (2004) Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to post-glacial recolonization routes of the Périgord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytol* **164**: 401–411.
- Nelson, M.A. (1996) Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac. *Trends Genet* **12**: 69–74.
- Pöggeler, S. (2001) Mating-type genes for classical strain improvements of ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 589–601.
- Primmer, C.R., Borge, T., Lindell, J., and Saetre, G.P. (2002) Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol Ecol* **11**: 603–612.
- Redecker, D., Szaro, T.M., Bowman, J.R., and Bruns, T.D. (2001) Small genets of *Lactarius xanthogalactus*, *Russula cremaricolor* and *Amanita francheti* in late stage ectomycorrhizal successions. *Mol Ecol* **10**: 1025–1034.
- Rubini, A., Topini, F., Riccioni, C., Paolocci, F., and Arcioni, S. (2004) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Mol Ecol Notes* **4**: 116–118.
- Selosse, M.A., Weiss, M., Jany, J.L., and 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. *Mol Ecol* **11**: 1831–1844.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd edn. London, UK: Academic Press.
- Soubabere, O., Jorge, V., Notteghem, J.L., Lebrun, M.H., and Tharreau, D. (2001) Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Ecol Notes* **1**: 19–21.
- Staben, C., and Yanofsky, C. (1990) *Neurospora crassa* a mating type region. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4917–4921.
- Tenaillon, M.I., Sawkins, M.C., Long, A.D., Gaut, R.L., Doebley, J.F., and Gaut, B.S. (2001) Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9161–9166.
- Timothy, Y.J., Moncalvo, J.M., Li, S., and Vilgalys, R. (2001) Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* **157**: 149–161.
- Vizzini, A. (2001) Relazioni filogenetiche del genere *Tuber* (Tuberaceae) nell'ambito dell'ordine Pezizales: analisi molecolari, carilogiche, macro- e micromorfologiche. Tesi Dottorato XIV ciclo. PhD Thesis, University of Turin, Italy.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.D. (eds). London, UK: Academic Press, pp. 315–322.
- Yan, Z.H., Rogers, S.O., and Wang, C.J.K. (1995) Assessment of *Phialophora* species based on ribosomal DNA internal transcribed spacers and morphology. *Mycologia* **87**: 72–83.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. (1999) Analysis of genetic structure of a *Suillus gevillei* populations in a *Larix kaempferi* stand by polymorphism of inter-simple sequence repeat (ISSR). *New Phytol* **144**: 55–63.
- Zhou, Z., Miwa, M., and Hogetsu, T. (2000) Genet distribution of ectomycorrhizal fungus *Suillus gevillei* populations in two *Larix kaempferi* stands over two years. *J Plant Res* **113**: 365–374.

2.3 Identification des mycorhizes de *T. magnatum* et des champignons ectomycorhiziens dans la truffière de Montemagno (Asti, Italie)

Contrairement à *T. borchii*, nous ne disposons pas encore de mycorhizes *in vitro* de *T. magnatum*. Donc, le seul moyen d'étudier la phase symbiotique de cette truffe est l'observation *in situ*. En fait, il persiste de nombreuses questions sur l'écologie des truffes et sur leur phase symbiotique : (1) A quelle période de l'année se forment les mycorhizes ?; (2) les mycorhizes de truffes sont-elles présentes dans les zones non productives des truffières ? (3) Quels sont les champignons ectomycorhiziens vivant dans les sols truffiers ?

Pour essayer de répondre à ces interrogations, nous avons échantillonné des mycorhizes en Novembre 2001 (période productive) et en Mai 2002 (période non productive) dans la truffière de *T. magnatum* (Montemagno, Asti). Même si le trufficulteur nous a laissé prélever des racines, nous n'avons pas pu réaliser un ample échantillonnage. Nous avons réalisé, tout d'abord, une analyse morphologique des mycorhizes en les classant par morphotype. Dans un deuxième temps, les apex racinaires correspondant à chaque morphotype ont été utilisés pour une analyse moléculaire avec l'ITS.

Au total nous avons identifié 39 morphotypes différents. Parmi ceux-ci, les *Telephoraceae* ont été les plus nombreux, suivis par les *Pezizales* et les *Sebacina*. Deux morphotypes ont été identifiés comme étant *T. magnatum*, en Mai 2002. Un dans une zone productive et l'autre dans une zone non productive.

Ce travail a permis de dire que les mycorrhizes de *T. magnatum* sont très rares même dans les zones productives. De plus, il ne semble pas y avoir de liaison entre la présence de mycorhizes et la production d'ascocarpes car les mycorhizes ont été trouvées pendant une période non productive. D'autre part, les *Telephoraceae*, *Pezizales* et *Sebacina* sont les taxa les plus abondants dans l'écosystème truffier étudié.

Morphological and molecular typing of the subterranean ectomycorrhizal community in a *Tuber magnatum* Pico truffle ground

Summary

Data on *Tuber magnatum* ecology are very limited. In order to elucidate the white truffle dynamic during its symbiotic stage and to identify fungi associated with it, ectomycorrhizal root tips were harvested in a *T. magnatum* natural truffle ground. Both morphological identification of morphotypes and molecular analysis of the ITS were realized and we found that i) *T. magnatum* mycorrhizae were rare and found only in Spring 2002 in productive and non productive areas; ii) the dominant fungal species were represented by the *Telephoraceae* and *Pezizales*.

Introduction

Some truffles are products in great demand on the food market in many countries. Among them, *Tuber magnatum* Pico, commonly known as the white truffle of Alba (*internet site: www.truffle.org*), is of special interest. Its unique taste and fragrance, as well as its limited availability, make *T. magnatum* fruitbodies one of the most expensive delicacies on the market. While *T. melanosporum* Vittad. is generally sold at €30-40/100gr in France, *T. magnatum* reached €300-400/100gr in Fall 2003. A productive truffle-ground represents therefore a conspicuous economic source for rural communities.

Truffles are ascomycetous fungi that form ectomycorrhizas (ECM) with the roots of trees, such as oak, poplar, willow, hazel (Harley and Smith 1983), and shrubs, such as *Cistus* (Fontana and Giovannetti 1978, 79). As a consequence, their life cycle is usually described as a succession of vegetative, symbiotic and reproductive phases (Lanfranco *et al.*, 1995), the last one being temporally dependent on the second one. Data on truffle ectomycorrhizas ecology are very limited, previous studies being mainly focussed on truffle mycorrhizal identification with isoenzymes (Urbanelli *et al.*, 1998) or molecular tools (Henrion *et al.*, 1994; Amicucci *et al.*, 1996; Paolocci *et al.*, 1999; Mabru *et al.*, 2001; Mello *et al.*, 2001; Rubini *et al.*, 2001). However, advances on *Tuber* spp. mycelium cultivation has allowed the mycorrhizal seedlings development with several truffles species. *T. melanosporum* was the first truffle produced in experimental fields using these inoculated seedlings (Chevalier & Grente, 1979). For example, in a *T. melanosporum* experimental plantation, first ascocarps were recorded after four years and 82% of transplanted seedlings had produced truffles after six years (Le Tacon *et al.*, 1988). These cultural techniques are available for *T. uncinatum* (Chevalier & Frochot, 1997) and *T. borchii* (Zambonelli *et al.*, 2002), however controlled production of *T. magnatum* is not yet possible.

T. magnatum ectomycorrhizas were identified only one times in wild samples using multilocus electrophoresis (Urbanelli et al., 1998). Mello et al. (2001) and Rubini et al. (2001) used specific primers, based on the *T. magnatum* Internal Transcribed Spacer (ITS) of the ribosomal DNA sequence, for a molecular characterization of mycorrhizal seedlings raised under controlled conditions. These molecular probes enabled a morphological characterization to be formulated for *T. magnatum* mycorrhizas. Furthermore, Mello et al. (2001), after screening a large number of samples, could estimate the occurrence of *T. magnatum* in the examined mycorrhizal seedlings, *T. magnatum* mycorrhizas being found in 20% of the examined samples. However, all of them were only found in controlled situations, i.e. a growth chamber or greenhouses. Failure to obtain *T. magnatum* mycorrhizas in nursery, i.e. under field conditions, was explained in term of competition with more aggressive truffles, such as *T. maculatum* and *T. borchii* (Mello et al., 2001). According to Marmeisse et al (2004), questions which are at the basis of our knowledge on the genetic diversity and dynamics of ectomycorrhizal fungi in natural ecosystems are still fully open: (i) How are abundant truffle mycorrhizas in a natural truffle ground? (ii) Does their presence match the fruitbody production? (iii) As a consequence, can we detect mycorrhizas exclusively in productive zones, or also in non-productive ones? (iv) Are they present all the year around or are temporarily limited? (v) Which other ectomycorrhizal fungi are present in a truffle ground?

Here, we aimed to elucidate the white truffle dynamic during its symbiotic stage and to identify fungi associated with *T. magnatum* in a natural truffle-ground. We took advantage on our previous work, where we mapped and genotyped *T. magnatum* fruitbodies collected in the natural truffle-ground of Montemagno (Piedmont, Italy) (Mello et al., 2004; cf. §2-2). During this survey two genotypes were found, each year for as long as five years, and productive and non productive areas were identified. As a second step, mycorrhizas samples were harvested and sorted into morphotypes by morphological criteria. This method, however, is dependent on many factors, as the age, the host tree species and environmental conditions. For this reason, morphological typing of ectomycorrhizas was supported by molecular methods using ITS. Molecular and morphotype techniques allowed ECM fungi identification on root tips, the fungal distribution analysis and provided information on the subterranean ECM fungal community. Even if the sampling was not extensive and many cautions were taken in digging the soil of the productive area under owner scrutiny, this work represents the first study on the *Tuber* symbiotic phase in a natural truffle ground.

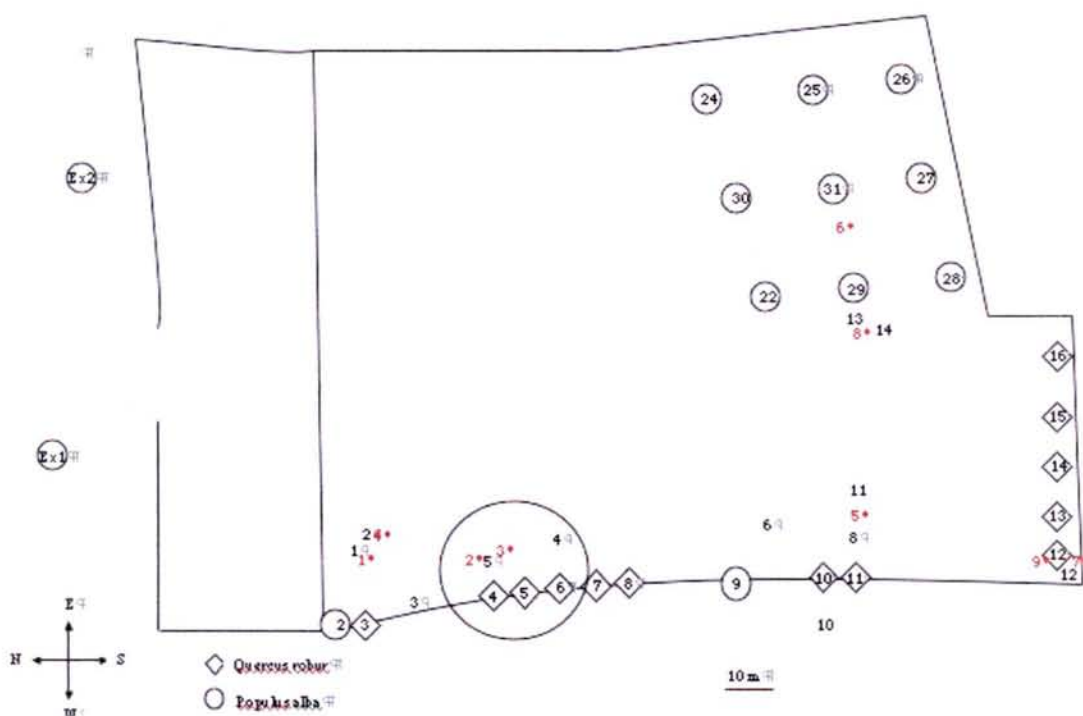


Figure 1. Map of the truffle-ground located at Montemagno (AT). Mycorrhizal samplings are indicated in black for November 2001 and in Red with asterisk for May 2002. According to Mello et al. (2004) (Fig. 1; §2.2) a non productive area has been defined and localized by black circle. In truffle ground there is grass vegetation.

Materials and Methods

Location of the truffle ground and geographical data

The truffle ground ($\approx 7.000 \text{ m}^2$) is placed in a valley in Montemagno (Asti, Piedmont, North Italy, $8^\circ 19' 35'' 4$ East, $44^\circ 59' 2'' 40$ North). It is characterised by the persistence of a moist soil, even in the hot season. The area is particularly useful for research studies because it does not present signs of anthropic activities, with the exception of the enlargement of a natural stream and the seasonal mowing. In this truffle ground *Populus nigra* L., *P. alba*, *P. tremula* L., *Quercus robur* L., *Salix alba* L., and *Tilia cordata* Miller are present; some trees are fifty years old, while most are younger. Records on productivity claim that this truffle ground has produced truffles since, at least, 1850. Trees start to produce, usually after 10-20 years. Fig. 1 shows the localisation of trees which are expected to be productive. Each years about 30 *T. magnatum* fruitbodies are harvested. Ascocarps harvesting positions analyzed by Mello et al. (2004) are indicated in Fig. 1. Productive and non-productive areas in could be defined in this truffle ground (Fig. 1). Twenty-one root samples were collected in the winter 2001 –2002 and in the Spring 2002: 12 samples were collected in November 2001, when it is period of the harvest of fruitbodies, and 9 in May 2002, when the harvesting is over (Table 1). The sampling position

was mapped in respect to the nearest tree (Figure 1, Table 1). When possible, up to three samples were collected within a small area under the tree (Table 1) and all together are indicated by only one star in Fig. 1. As already mentioned, the limited number of samplings was due to the risk of breaking down the fungal web in the soil of this productive truffle-ground.

Morphological analysis

Root samples were collected in soil volume of 10 x 10 x 10 cm. The root system was rinsed in water and observed under a stereo dissecting microscope to look for ectomycorrhizal roots. Mycorrhizal root tips of each sample were sorted into morphotypes on the basis of colour, mantle shape and surface texture, presence of cystidia, and EM branching pattern. When necessary, cross sections were made and examined under a light microscope for the presence of the Hartig net.

Molecular analysis

Each morphotype, grouping from 1 to 10 similar mycorrhizal tips, was subjected to the molecular analysis.

Total DNA was extracted by using the Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen SA, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed with ITS1f (Gardes & Bruns, 1993) and ITS4 (White *et al.*, 1990) primers. rDNA libraries were produced by isolating the amplicons from gel, ligating them into the pGEM-T vector (Promega, Madison Wis.) and transforming the plasmids into competent JM109 cells. Bacterial colonies containing plasmids with rDNA inserts were identified by PCR. To sort the clones into groups the rDNA inserts were amplified by PCR, digested individually with two DNA restriction endonuclease treatments (*Hinf* I, *Sau3A* I) and resolved on 2% agarose gels. Clones, which showed different restriction patterns, were sequenced. Similarities of the rDNA clones to sequences in the GenBank database were determined by using BLAST (NCBI). Accession numbers are listed in Table 1.

Results and Discussion

This survey is the first attempt to identify and to study the ecology of the symbiotic phase of *T. magnatum*. Notwithstanding the drawback of having a limited number of samples (21 samplings sorted in 40 morphotypes) our investigation allowed us to identify *T. magnatum* mycorrhizas in a natural truffle ground. In addition, morphotyping and ITS sequencing of these mycorrhizal samples provided novel information on the ectomycorrhizal and endophytic species living in a *T. magnatum* truffle ground (Table 1).

Table 1. Morphological and molecular typing of two root samplings in November 2001 and May 2002. Nearest tree is indicated. Samplings (S) have been realized in a productive, i.e; where at least one fruitbody has already been harvested, (Prod.) and non productive, where it has never been harvested fruitbody, (Not Prod.) area of the truffle ground.

Tree	Area	November 2001		May 2002			
		S	Morphotypes Molecular analysis	S	Morphotypes Molecular analysis		
2	Prod.	1	unidentified unidentified <i>Epicoccum</i> sp, Pezizaceae	1	unidentified <i>Tuber magnatum</i> <i>Tuber</i> sp <i>Tomentella</i> sp	<i>Tomentella/Telephora</i> <i>Tuber magnatum, Helvella</i> sp (nr) <i>Tuber maculatum</i> <i>Tomentella</i> sp, <i>Verticillium</i> sp, <i>Dothideomycetes</i>	
		2	<i>Tomentella</i> sp <i>Tuber maculatum</i>	4	<i>Tomentella</i> sp	<i>Tomentella</i> sp, <i>Verticillium</i> sp, <i>Dothideomycetes</i>	
	Prod.	3	<i>Tomentella</i> sp unidentified <i>Helvella lacunosa, Tetracadium</i> sp, <i>Tuber rufum</i>				
4	Not prod.	5	<i>Scleroderma</i> sp unidentified unidentified unidentified	<i>Scleroderma</i> sp <i>Strumella</i> sp, <i>Scleropezizula</i> sp, <i>Sebacina</i> sp <i>Tomentella</i> sp Sebacinaceae	2	<i>Tuber</i> sp <i>Tomentella</i> sp <i>Tomentella</i> sp	<i>Helvella</i> sp (nr) <i>Tomentella</i> Amphisphaeriaceae, <i>Alternaria</i> sp
			3	unidentified	unidentified	<i>Tuber magnatum, Sebacina incrustans, Helotiales</i> (ericoids and endophytes)	
6	Not prod.	4	unidentified unidentified <i>Tomentella</i> sp	<i>Mortierella alpina</i> , Fungal endophyte, Nectriaceae <i>Tomentella</i> sp			
9	Prod.	6	<i>Tuber</i> sp	Ericoid endophyte (Helotiales), Nectriaceae			
10	Prod.	10	unidentified	Sebacinaceae			
11	Prod.	8	<i>Tomentella</i> sp	Agaricales, <i>Tomentella</i> sp	5	No mycorrhizas	
	Prod.	11	<i>Tuber</i> sp	Agaricales			
12	Prod.	12	<i>Tuber</i> sp <i>Tomentella</i> sp <i>Tuber</i> sp	Sebacinaceae <i>Tomentella</i> sp <i>Nectria, Tomentella</i> sp	9	unidentified <i>Tomentella</i> sp	Sebacinaceae
		7	unidentified				
29	Prod.	13	<i>Tomentella</i> sp unidentified	<i>Tomentella</i> sp Cortinariaceae, Sebacinaceae	8	<i>Tomentella</i> sp unidentified	<i>Tomentella</i> sp <i>Tetracadium</i> sp
	Prod.	14	<i>Tuber</i> sp unidentified <i>Tomentella</i> sp	<i>Leptosphaeria</i> sp, <i>Nectria</i> sp, <i>Sebacina epigea, Tetracadium</i> sp, <i>Pezizomycotina</i> Cortinariaceae, Agaricales <i>Tomentella</i> sp, <i>Nectria</i> sp			
31	Not prod.				6	<i>Tuber</i> sp	<i>Tuber maculatum</i>

First glance at the subterranean ECM community

Morphological analysis allowed to distinguish 39 morphotypes, among them 16 were unidentified (Table 1). Morphotypes identities were confirmed in 14 out of 23 by the molecular analysis, while in 6 cases there were differences between morphological and molecular identification (Table 1). *Telephoraceae* was the most frequent family (13 out of 39 morphotypes, 32%), often recognized by both morphological and molecular analysis (Table 1). Except for one sample (S 1 of May 2002), this family was represented by *Tomentella*. *Tomentella* sequences alignment – which were found in our samplings - showed a broad heterogeneity suggesting the presence of different species. About 70 species of tomentelloid fungi are known, assembled into four genera, viz. *Amaurodon*, *Pseudotomentella*, *Tomentella* and *Tomentellopsis* (Larsen 1971, 1974; Stalpers 1993; Koljalg 1996). *Thelephora*, a genus closely related to tomentelloid fungi, comprises about 40 species, of which seven are found in Sweden (Corner 1968; Stalpers 1993; Koljalg 1996; Hallingbäck and Aronsson 1998). Recent studies have indicated that tomentelloid fungi may be a widespread and important component of EM communities, with the highest species richness being found in temperate coniferous and broad-leaved forests (Koljalg et al. 1996, 2000).

A second important group in the truffle ground was represented by the *Pezizales* order (11 out of 39 morphotypes). These were *Pezizaceae*, *Helvella* sp, *Strumella* sp and *Tuber* sp. (Table 1). They were mainly found in one area of the truffle ground near trees 2 and 4 in two samplings. For example, under the tree N 2 we have observed that: 1) *T. magnatum* was identified in May 2002; 2) *T. rufum* was found in November 2001; 3) *T. maculatum* was present in November, which is a fructification period, as well as in May; 4) the fungal species close to *Helvella* was present both, in November and May, always associated to *Tuber* species. In fact, *T. maculatum* ascocarps have been harvested in this truffle ground near trees 2 and 4 but we do not know if *T. rufum* ascocarps have already been produced (Gavazza, personal communication).

Sebacina incrustans was detected under the tree N 4 where *T. magnatum* and ericoid and/or endophyte fungi belonging to *Helotiales* are present. *Sebacina* sp. were found on 9 out of 39 morphotypes. Until recently, this family was not considered in the major compilations of ectomycorrhizal taxa (Agerer 1987-98, Molina et al. 1992, Agerer et al., 1996-2001, Smith and Read 1997). However, Urban et al. (2003) identified the fungal partner of one ectomycorrhizal sample as *Sebacina incrustans* confirming the hypothesis that the ectomycorrhizal status might be common in the *Sebacinaceae* (Weib and Oberwinkler 2001). A Heterobasidiomycetous species of the *Sebacinaceae* family has been shown to form ectomycorrhizas on temperate forest trees (Selosse et al., 2002), on *Polygonum viviparum* in alpine grasslands (Sonstebo 2002) and in

Australian forests where they are common ectomycorrhizal associates of *Eucalyptus marginata* (Glen et al., 2002). Our finding of a *Sebacina* sp associated to *T. magnatum* ectomycorrhiza is in agreement with the discovery of sebacinoid ectomycorrhizas associated to ascomycetous ectomycorrhizas by Urban et al., (2003) and Selosse et al., (2002). Buscot & Kottke (1990) and Buscot (1994) reported a close association between the ectomycorrhizas of *Morchella* (Pezizales) and those of an unidentified heterobasidiomycete that, because of its dolipore ultrastructure (i.e. not perforated parentheses), likely belong to Sebacinaceae.

Are Truffle ecosystems a particular one or there are common characteristic with other ecosystems? In a *T. magnatum* natural truffle ground study in Italy, Rossi et al. (2002) identified several *Tuber*-like ectomycorrhizas morphotypes. However, they did not confirm morphological identification by molecular analysis and no information on other ectomycorrhizal species are provided. Other similar ecosystems have been studied by De Miguel et al. (2002), which analysed several *T. melanosporum* cultivated beds in Spain. They have harvested sporocarps of seven truffle species (*T. aestivum* Vitt., *T. brumale* Vitt., *T. excavatum* Vitt., *T. melanosporum* Vitt., *T. mesentericum* Vitt., *T. panniferum* Tul & C. Tul) and ten other hypogeous and Gastromycetes (*Genea* sp., *Hymenogaster* sp., *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* and *Scleroderma verrucosum*). Twenty morphological morphotypes of ectomycorrhizas have been identified, among them six truffle species, *Scleroderma* type and *Tomentella subtestacea*. So, it seems that *Telephoraceae* (i.e. *Tomentella*) and Pezizales (i.e. *Tuber* and *Heliotiales*) are abundant in truffle ecosystem. In fact, *Telephoraceae* is among the most abundant and frequent taxon on ECM roots in conifer communities in both Europe and North America (Gardes & Bruns, 1996; Jonsson et al., 1999; Taylor & Bruns 1999). This suggests that truffle ecosystem in sud Europe is predominated by same ECM species than other community in North Europe (e.g. *Telephoraceae*).

Identification of T. magnatum mycorrhizas

Until now, *T. magnatum* mycorrhizas were reported in experimental conditions (Mello et al., 2001; Rubini et al., 2001) and only one time with wild samples (Urbanelli et al., 1998). In the present study mycorrhizal tips of *T. magnatum* were identified twice. In one case, the morphological identification was confirmed by the ITS analysis (S1 May 2002; Table 1). In the second case the morphotype was unidentified and the identification of its old mycorrhizas was limited to the molecular analysis. These results indicated that *T. magnatum* mycorrhizae are rare even in a well productive area (Mello et al., 2004), 2 out of 39 morphotypes, representing ≈ 5%. They were found both during spring 2002, e.g. in a non-productive period, and in a non-productive area (near tree 4 see Fig. 1 In Mello et al., 2004), suggesting that there is no a direct linkage between mycorrhizas and

fruitbodies. Moreover, we show that *T. magnatum* is present in non-productive area.

The very low occurrence of *T. magnatum* mycorrhizas is not so surprising, since a low abundance of a fungal species at the mycorrhizal level has been already reported by Gardes and Bruns (1996). These authors found that *Suillus pungens* ECM root tips were rare in a *Pinus muricata* forest whereas *S. pungens* sporocarps were abundant. In the same forest *Russula amoenolens* root tips were abundant, whereas *R. amoenolens* sporocarps were rare. Dahlberg et al. (1997) highlight that macrofungi species, which accounted for 70% of the annual fruiting biomass correspond to less than 30% of the colonized root tips. According to Taylor (2002), *Cortinarius* was the most abundant genus forming 42.3% of sporocarps in a *Pinus sylvestris* stand at Riddarhyttan; however belowground only 1.6% of the mycorrhizal tips examined could be attributed to this genus. Bonello et al. (1998) explain the condition of low mycorrhizal percentage and the spread and persistence of a large *S. pungens* genet fruiting abundantly with 3 hypothesis: (1) *S. pungens* is efficient to obtain C from its host that few mycorrhizal connections are needed for significant C transfer; (2) large genets visit the roots of more trees, pooling, consequently, more total C than smaller genets; (3) a fraction of the C is obtained saprotrophically.

In conclusion, this study represents a first attempt to give a glimpse at the mycorrhizosphere in a *T. magnatum* natural truffle ground. We have found that *T. magnatum* ectomycorrhizas are very rare. Moreover, root tips sampling did not correspond to fructification harvesting, since we identified one *T. magnatum* morphotype in a non productive area of the truffle ground. However, further samplings are surely necessary to define *T. magnatum* mycelium distribution. On the other hand, most abundant morphotypes belong to *Telephoraceae*, *Pezizales* and *Sebacina*. These species are also the most abundant symbiotic taxa in other ecosystems in North Europe, America and Australia. In the future, it will be interesting to analyse fungal diversity not only at root level but directly in the soil. Such analysis would allow us to improve knowledge on truffle ecosystems and as a consequence to enhance the success of experimental truffle production.

Bibliography

- Agerer R (ed.) (1987-98) Colour Atlas of Ectomycorrhiza. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer R, Danielson RM, Egli S, Ingleby K, Luoma, D Tré R (eds) (1996-2001) Descriptions of Ectomycorrhiza 1-7.
- Amicucci A., Rossi I., Potenza L., Zambonelli A., Agostini D., Palma F., Stocchi V., 1996. Identification of ectomycorrhizae from *Tuber* species by RFLP analysis of the ITS region. *Biotechnology Lett.*, 18, 821-826

- Bonello P., Bruns T.D., Gardes M., 1998. Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytologist*, 138, 533-542
- Buscot F., 1994. Ectomycorrhizal types and endobacteria associated with ectomycorrhizas of *Morchella elata* (fr) Boudier with *Picea abies* (L) Karst. *Mycorrhiza*. 4 (5), 223-232
- Buscot F., Kottke I., 1990. The association of *Morchella-rotunda* (Pers) Boudier with roots of *Picea abies* (L) Karst. *New Phytologist*, 116 (3), 425-430.
- Chevalier G. & Grente J., 1979. Application pratique de la symbiose ectomycorhizienne : production à grande échelle de plants mycorhizés par la truffe. *Mushr. Sci.* 10 (2), 483-505.
- Chevalier G., Frochot H., 1997. *La truffe de Bourgogne*, Ed. Pétrarque, 257p
- Corner E.J.H. (1968) A Monograph of Thelephora (Basidiomycetes). Beihefte zur Nova Hedwigia 27: 1-110.
- Dahlberg A., Jonsson L., Nylund J.E., 1997. Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Canadian Journal of Botany*, 75, 1323-1335
- De Miguel A., De Roman M., Etayo M.L., 2002. Mycorrhizal fungi competing with *Tuber melanosporum* Vitt. In cultivated truffle beds in north-eastern Spain. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Fontana A. and G. Giovannetti - 1978-1979: *Simbiosi micorrizica fra Cistus incanus L. ssp. incanus e Tuber melanosporum Vitt.* *Allionia* 23: 5-11.
- Gardes M and Bruns TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gardes M, Bruns TD. 1996. Community structure of ecto-mycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* 74: 1572-1583.
- Gehring CA, Theimer TC, Whitham TG, Keim P 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 78: 1562-1572.
- Glen M, Tommerup IC, Bougher NL, O'Brien PA 2002. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests? *Mycorrhiza* 12 (5): 243-247.
- Hallingbäck T and Aronsson G (1998) *Macrofungi and myxomycetes in Sweden and their ecology*. 2nd revised and extended printing. Artdatabanken, SLU, Uppsala.
- Harley J.L. & S.E. Smith - 1983: *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Henrion B., G. Chevalier & F. Martin, 1994. Typing truffle species by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycologia* 98, 37-43.
- Jonsson T, Kokalj S, Finley R, Erland S 1999. Ectomycorrhizal community structure in a limed spruce forest. *Mycol. Res.* 103 (4): 501-508.
- Karen O, Hogberg N, Dahlberg A, Jonsson L, Nylund JE 1997. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ecto-mycorrhizal fungi in Fennoscandia as detected by endonuclease analysis. *New Phytologist* 136: 313-325.
- Koljalg U (1996) *Tomentella* (Basidiomycota) and related genera in temperate Eurasia, Synopsis Fungorum 9. Fungiflora, Oslo.

- Kõljalg, U., A. Dahlberg, A. F. S. Taylor, E. Larsson, N. Hallenberg, J. Stenlid, K.-H. Larsson, P. M. Fransson, O. Kårén, L. Jonsson 2000. Diversity and abundance of resupinate thelephoroid fungi as ectomycorrhizal symbionts in Swedish boreal forests. *Molecular Ecology* 9 (12): 1985-1996.
- Larsen MJ (1971) The genus *Pseudotomentella* (Basidiomycetes, Thelephoraceae s.str.) *Nova Hedwigia*, 22: 599-619.
- Larsen MJ (1974) A contribution to the taxonomy of the genus *Tomentella*, *Mycologia Memoirs*, 4: 1-145.
- Le Tacon F., J. Garbaye, D. Bouchard, G. Chevalier, J. M. Olivier, J. Guimberteau, N. Poitou & H. Frochot, 1988. Field result from ectomycorrhizal inoculation in France. *In Canadian workshop on Mycorrhizal in Forestry* (edited by Lalonde, Pichey) : 51-74
- Mabru D., Dupré C., Douet J. P., Leroy P., Ravel C., Ricard J. M., Medina B., Castroviejo M., Chevalier G., 2001. Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products : fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11 : 89-94.
- Marmeisse R, Guidot A, Gay G, Lambilliotte R, Sentenac H, Combier JP, Melayah D, Fraissinet-Tachet L, Debaud JC, 2004. *Hebeloma cylindrosporum* - a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* 163 (3): 481-498
- Mello A., Murat C., Vizzini A., Gavazza V., Bonfante P., 2004. *Tuber magnatum* Pico, a species of limited geographic distribution: its genetic diversity inside and outside a truffle ground. *Environmental Microbiology*, In press.
- Mello, A., Fontana, A., Meotto, F., Comandini, O., Bonfante P., 2001. Molecular and morphological characterization of *T. magnatum* mycorrhizas in a long-term survey. *Microbiol Res* 155: 279-284.
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis community – ecological consequences and practical implications. *In Mycorrhizal Functioning* (M.F. Allen, ed.): 357-423. Chapman and Hall, London.
- Paolocci F., Rubini A., Granetti B., Arcioni S., 1999. Rapid molecular approach for a reliable identification of *Tuber* spp. Ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Ecology* 28 : 23-30.
- Pritsch K, Boyle H, Munch JC, Buscot F 1997. Characterization and identification of black alder mycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *New Phytologist* 137: 357-369.
- Rossi I., Bertini L., Amicucci A., Cecchini M., Gregori L., Sacchi A., Zambonelli A., Stocchi V., 2002. Study of a natural *Tuber magnatum* Pico truffière in central Italy. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. *Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Rubini A, Paolocci F, Granetti B, Arcioni S (2001) Morphological characterization of molecular-typed *Tuber magnatum* ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11: 179-185.
- Selosse M-A., Bauer R., Moyersoen B. (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist* 155: 183-195.
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
- Sønstebo J.E. - 2002: *Molecular Ecology of Ectomycorrhizal Fungi on *Bistorta vivipara* in four alpine tundra communities*. MSc thesis, University of Oslo, Norway.
- Stalpers JA (1993) The Aphyllophoraceous fungi I. Keys to the species of the Thelephorales. *Studies in Mycology*, 35: 1-168.

- Taylor AFS 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244: 19-28.
- Taylor DL and Bruns TD 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* 8: 1837-1850.
- Urban A., Weiß M., Bauer R. (2003) Ectomycorrhizas involving sebacinoid mycobionts. *Mycol Res* 107 (1): 3-14.
- Urbanelli S., Sallicandro P., De Vito E., Bullini L., Palenzona M., Ferrara AM 1998 Identification of Tuber mycorrhizae using multilocus electrophoresis. *Mycologia* 90 (3): 389-395.
- Weiß M and Oberwinkler F. (2001) Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups – hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 105: 403-415
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B. Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.D. (Eds.), *PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, London, 315-322
- Zambonelli A., Iotti M., Giomaro G., Hall I., Stocchi V., 2002. *T. borchii* cultivation : an interesting perspective. *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation*. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001

3. DISCUSSION GENERALE

Les truffes sont étudiées depuis plus de 500 ans (cf. § 1.1.3), mais les études se focalisant sur leur biologie, leur taxonomie et la maîtrise de leur culture se sont multipliées les vingt dernières années. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'améliorer nos connaissances sur la taxonomie de plusieurs espèces, mais aussi de mettre au point des diagnostics moléculaires utilisés par les services des fraudes. Il est maintenant possible d'identifier rapidement la plupart des truffes européennes et asiatiques à partir d'échantillons environnementaux ou d'aliments (Douet et al., 2004 ; Mabru et al., 2004). En revanche, les données concernant la diversité génétique et la structure génétique des populations de truffes étaient encore limitées au début de ce projet de thèse.

Lors de cette étude, je me suis focalisé sur l'analyse de la structure génétique de la truffe noire du Périgord (*T. melanosporum*), sur l'ensemble des régions productives françaises (échelle macro-géographique), et de celle de la truffe blanche du Piémont (*T. magnatum*). J'ai aussi étudié plus précisément une truffière de *T. magnatum* (échelle micro-géographique) au niveau des ascocarpes mais aussi des mycorhizes. Ce travail a permis d'émettre des idées nouvelles sur l'écologie de ces deux truffes. En particulier :

1- Il existe une différenciation génétique chez *T. melanosporum*, avec deux lignées, l'une à l'Est et l'autre à l'Ouest du Massif Central. Nous avons suggéré deux voies de recolonisations post-glaciaires pour cette truffe : la voie de la vallée du Rhône et la voie de l'Atlantique.

2- La variabilité génétique de *T. melanosporum* pourrait expliquer les variations phénotypiques observées, entre autres celles concernant les différences organoleptiques.

3- Nous avons trouvé des marqueurs polymorphes pour *T. magnatum* suggérant ainsi une variabilité génétique notable pour cette truffe. Les outils que nous avons mis au point pourront dans le futur être utilisés à grande échelle dans l'étude de la diversité génétique de cette truffe.

4- Au sein d'une truffière naturelle de *T. magnatum* (Montemagno, Asti), il peut exister plusieurs génotypes.

5- Nous avons identifié des mycorhizes de *T. magnatum* lors d'une période non productive. Nous avons aussi montré que ce champignon est présent dans des zones non productives de la truffière. La production des tissus symbiotiques (ectomycorhizes) peut donc être disjointe de la formation des corps fructifères. Enfin, les espèces mycorhiziennes majoritaires dans le sous-sol de la truffière de Montemagno sont les *Telephoraceae*, les *Pezizales* et les *Sebacina*.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous discuterons de ces différents points et verrons quelles sont leurs applications possibles pour le monde de la trufficulture.

3.1 Diversité génétique et structure génétique chez *T. melanosporum* et *T. magnatum*

3.1.1 L'ITS, un locus polymorphe chez les truffes

Comme nous l'avons vu au paragraphe 1.4.3, les études RAPD (Lanfranco et al., 1993 ; Gandeboeuf et al., 1997) indiquent qu'il existe deux groupes d'espèces de truffes : (1) les espèces ayant un niveau élevé de diversité génétique (par exemple *T. uncinatum* et *T. borchii*) ; (2) les espèces ayant un faible niveau de diversité génétique (par exemple *T. melanosporum* et *T. magnatum*). Le premier objectif que nous avons au début de cette thèse était donc d'identifier des régions génomiques variables pour ces deux espèces considérées comme peu variables. Dans le cas de *T. melanosporum*, nous savions que l'ITS était polymorphe (Roux et al., 1999 ; Mabru et al., 2001 ; Murat, 2001). En revanche, pour *T. magnatum*, les seules données disponibles concernaient les isoenzymes (Frizzi et al., 2001). Pour ces deux espèces, le séquençage de l'ITS a permis d'identifier plusieurs haplotypes (10 pour *T. melanosporum* et 3 pour *T. magnatum*). Étant donné que ce locus est considéré comme conservé au niveau intraspécifique, comment expliquer ce polymorphisme pour des espèces ayant par ailleurs un bas niveau de diversité génétique ?

En effet, le polymorphisme peut être observé à trois niveaux : (1) au niveau interspécifique ; (2) au niveau intraspécifique, c'est-à-dire entre les individus de la même espèce et (3) au niveau de l'individu.

Chez la plupart des Eucaryotes, le taux d'évolution concertée est suffisant pour homogénéiser les variations entre les répétitions d'ADNr au sein des individus et de l'espèce (Dover, 1982 ; Vollmer et Palumbi, 2004). Ce processus d'évolution concertée a été observé pour la première fois lors d'une étude de l'ADNr de deux espèces de Grenouilles (Brown et al., 1972). En fait, l'évolution des séquences ITS est liée à la sélection naturelle, à la dérive génétique et au mécanisme de recyclage moléculaire (*molecular turnover mechanism*) (Dover, 1982). Ces derniers comme la *gene conversion* et les *crossing-over* inégaux joueraient un rôle important dans les processus d'évolution concertée, mais leurs impacts dépendent des taux de recombinaisons et de mutations (Elder et Turner, 1995).

Toutefois, les analyses de restriction et de séquençage direct de l'ITS de plusieurs espèces fongiques, et entre autres des truffes, révèlent un niveau

de polymorphisme intraspécifique non négligeable de ce locus (Glen et al., 2001 ; Mello et al., 2002 ; Jany et al., 2002). Il semble donc que l'ITS soit plus variable, au niveau intraspécifique, que ce que l'on pensait. D'autre part, il existe des espèces pour lesquelles l'ITS est polymorphe au sein de l'individu, c'est-à-dire entre les différentes copies d'un même noyau. C'est le cas des Sauterelles (Parkin et Butlin, 2004), des coraux (Vollmer et Palumbi, 2004) et des champignons endomycorhiziens (Lanfranco et al., 1999 ; Pawlowska et Taylor, 2004). Chez les truffes, nous n'avons encore jamais mis en évidence de polymorphisme de l'ITS au sein d'un même individu. D'autre part, l'absence d'hétérozygotes lors de l'analyse de divers loci (Frizzi et al., 2001 ; Bertault et al., 2001 ; Paolocci et al., 2004 ; Rubini et al., 2004) suggère une reproduction homothallique pour les truffes. Cela indiquerait qu'il n'existe pas de croisements entre individus différents de la même espèce et donc que les processus d'évolution concertée au sein d'une espèce n'auraient pas un rôle important. En d'autres termes, l'apparition d'une mutation chez un individu ne serait pas éliminée par évolution concertée car il n'y a pas de croisement entre cet individu et un autre (Figure 24). Cela pourrait expliquer la présence de plusieurs haplotypes d'ITS chez les truffes.

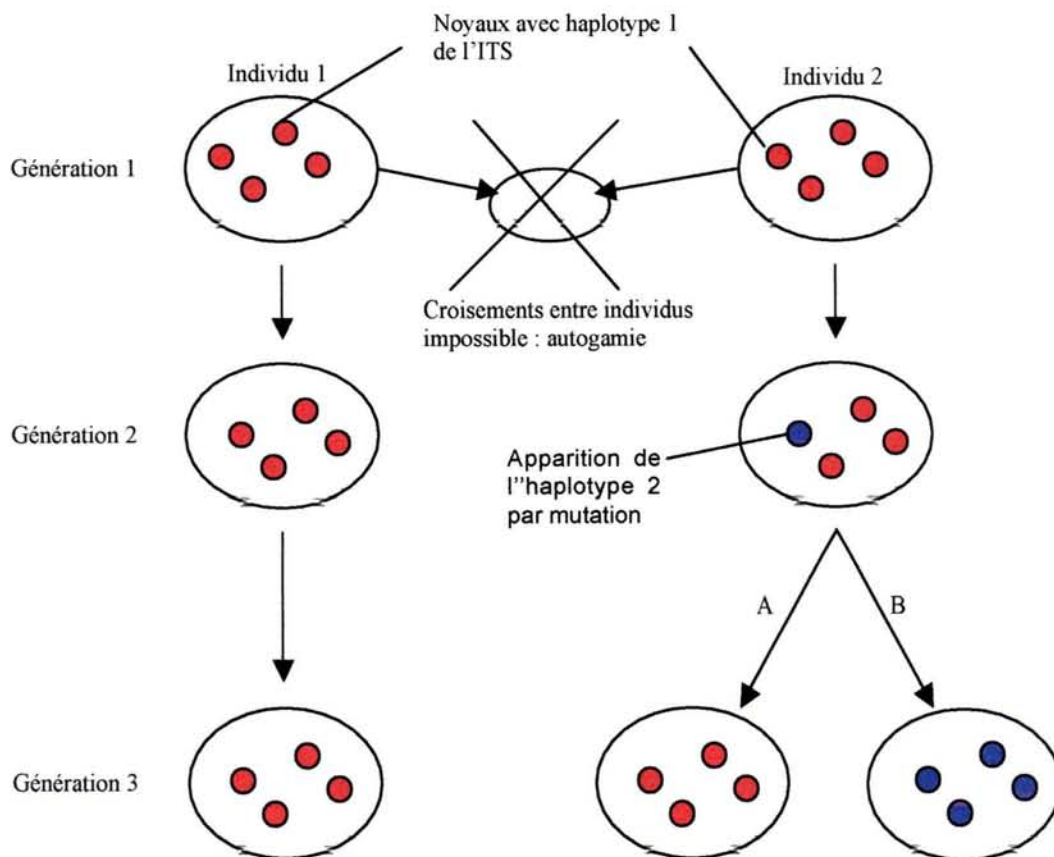


Figure 24. Mécanisme pouvant expliquer l'existence de plusieurs haplotypes de l'ITS chez les truffes. A la génération 1 tous les individus ont le même haplotype ITS dans leurs noyaux (1 en rouge). A la génération 2 apparaît par mutation un autre haplotype (2 en bleu) dans un noyau d'un individu de la lignée 2. Pour cet individu, il existe une homogénéisation des répétitions ITS par évolution concertée, deux voies sont alors possibles: (A) l'haplotype 2 est éliminé ou (B) l'haplotype 2 est conservé. Par contre, étant donné qu'il n'existe pas de croisements entre individus (reproduction homothallique ou autogamie) il n'y a pas d'homogénéisation des haplotypes ITS entre eux, ce qui expliquerait la présence de plusieurs haplotypes ITS au sein des espèces truffes.

3.1.2 Mise en évidence d'une structure génétique chez *T. melanosporum* et *T. magnatum*

L'analyse de la distribution géographique des haplotypes de l'ITS de *T. melanosporum* a mis en évidence une importante différenciation génétique entre populations de l'Est et de l'Ouest de la France (§2.1). En ceci nos résultats divergent des données jusque-là disponibles. En effet, l'analyse RAPD et microsatellite (RAMS et SSR) n'a pas permis d'identifier de structuration génétique pour *T. melanosporum* (Bertault et al., 1998, 2001). D'autre part, contrairement aux études antérieures nous avons étendu notre échantillonnage aux populations septentrionales (Bourgogne, Lorraine). L'existence d'une telle différence entre les populations de l'Est et de l'Ouest de la France indique qu'il existe peu d'échanges génétiques (*Gene flow*) entre ces populations. Tout échange génétique serait empêché par le Massif Central qui jouerait le rôle de barrière géographique, mais aussi écologique car les sols de ces montagnes ne sont pas calcaires.

Étant donné que ces résultats ont été obtenus seulement par l'étude d'un seul locus, sont-ils fiables ?

En effet, chaque partie du génome évolue de façon différente et il est difficile de généraliser les résultats obtenus par l'analyse d'un seul locus. Par exemple, James et al. (2001) montrent que les valeurs de *Fst* (Indice de différenciation génétique) pour *Schizophyllum commune* sont différentes d'un locus à l'autre : de 0,487 pour l'IGS1 à 0,008 pour le locus d'incompatibilité sexuelle A (*mating-type A*). De même, Le Quéré (2004) montre que plusieurs gènes codant des protéines de *Paxillus involutus* soumis à une pression de sélection ont une évolution différente. En effet, le taux de mutation diffère en fonction de la capacité mycorrhizogène des différentes souches. En d'autres termes, le taux de mutations de certains gènes régulés lors de la symbiose est supérieur pour une souche ne formant pas de mycorhizes. Ceci s'expliquerait par une baisse de la pression de sélection pour ce locus dans le cas de cette souche fongique. Il serait donc indispensable d'étudier d'autres régions génomiques de *T. melanosporum*, et entre autres des gènes fonctionnels, afin de voir si la structure génétique trouvée avec l'ITS est confirmée.

Cependant, le séquençage de plus de 50 Kpb (SCAR) (Murat, 2001) et de la famille multigénique codant un probable facteur d'incompatibilité (données obtenues en collaboration avec Mirco Iotti et Alessandra Zambonelli) ne présente pas de polymorphisme. D'autre part, j'ai aussi analysé un locus microsatellite sur l'ensemble des 188 ascocarpes (F12I ; Bertault et al., 2001) pour lequel trois haplotypes ont été identifiés. Toutefois, un seul de ces haplotypes a une fréquence supérieure à 5%, ce locus ne peut donc pas être considéré comme polymorphe.

Ces résultats confirment le faible niveau de polymorphisme de *T. melanosporum* déjà mis en évidence par RAPD, RAMS et les Isoenzymes (cf. § 1.4.3).

Dans le cas de *T. magnatum*, l'analyse de la distribution géographique des haplotypes de l'ITS et de la région SCAR-A21inf suggère aussi une structure génétique (cf. § 2.2). Toutefois, nous ne disposons pas d'un échantillonnage permettant d'analyser la structure macro-géographique de cette espèce.

3.1.3 Phylogéographie des truffes

À partir du Tertiaire (65 millions d'années), la Terre est devenue plus froide, avec des oscillations qui ont augmenté en amplitude jusqu'à une série de glaciations au Quaternaire (2,4 millions d'années) (Hewitt, 2000). Avec l'augmentation des données provenant de carottes de glaces, de sédiments et de pollens fossiles, il est maintenant possible d'avoir une idée sur les effets de ces changements climatiques rapides sur les plantes et les animaux. Des espèces disparaissent, d'autres colonisent de nouveaux habitats et certaines survivent dans des refuges pour ensuite recoloniser le milieu, ceci se produisant à multiples reprises (Hewitt, 2000). Ces expansions ont probablement été produites par des événements de dispersion à longue distance permettant de coloniser les habitats avant d'autres espèces ; cet effet fondateur conduisant à une perte d'allèle et une accumulation d'homozygotes (Hewitt, 1993). En théorie, il existe donc une plus grande richesse en haplotypes au niveau des refuges, alors qu'en s'éloignant de ces régions, le niveau de diversité génétique diminue (Hewitt, 2000 ; Lowe et al., 2000 ; Petit et al., 2003). Toutefois, les caractéristiques propres aux espèces, comme leur mode de migration, et l'existence de refuges plus au nord peuvent altérer ce profil (Petit et al., 2003).

Les événements climatiques ont donc un effet sur la structure des génomes via les phénomènes de recolonisation géographique. C'est pourquoi, l'étude de la structure génétique actuelle d'une espèce peut nous informer sur son histoire et sur ses routes de recolonisation post-glaciaire ; il s'agit de l'analyse phylogéographique.

Quels sont les principaux refuges et les principales voies de recolonisation post-glaciaire en Europe?

Les forêts tempérées étaient limitées aux régions méditerranéennes comme la péninsule Ibérique, l'Italie et les Balkans (Petit et al., 2003). Toutefois, certains arbres auraient trouvé refuge plus au Nord. Par exemple, *Pinus sylvestris* aurait survécu au Sud de l'Irlande (Sinclair et al., 1999). En fait, le Sud de l'Europe a aussi été le refuge de plusieurs animaux comme les hérissons (Santucci et al., 1998 ; Seddon et al., 2001) et les ours (Hewitt, 2000). Hewitt (2000) identifie trois types de comportements différents lors de la glaciation (Figure 25) :

1- Les espèces ayant comme principal refuge les Balkans, (plus rarement l'Italie et l'Espagne). Les migrations à partir de ces trois refuges sont restreintes à cause des barrières géographiques que sont les Alpes et les Pyrénées. L'Aulne, le Hêtre, la Sauterelle et le Triton ont suivi ces voies de recolonisation (Figure 25-1)

2- La colonisation du Nord de l'Europe a eu lieu à partir de trois refuges : l'Espagne, l'Italie et les Balkans ; c'est le cas du Hérisson, du Chêne et du Sapin (Figure 25-2)

3- L'ours a recolonisé l'Europe à partir de l'Espagne et des Balkans ou du Caucase (Figure 25-3).



Figure 25. Les trois principaux types de recolonisation post-glaciaire de l'Europe (d'après Hewitt, 2000).

Quand est-il pour T. melanosporum ?

Lors de cette thèse, nous avons identifié une structure génétique pour *T. melanosporum* avec des différences entre les populations de l'Est et de l'Ouest de la France (cf. § 2.1 ; Figure 26).

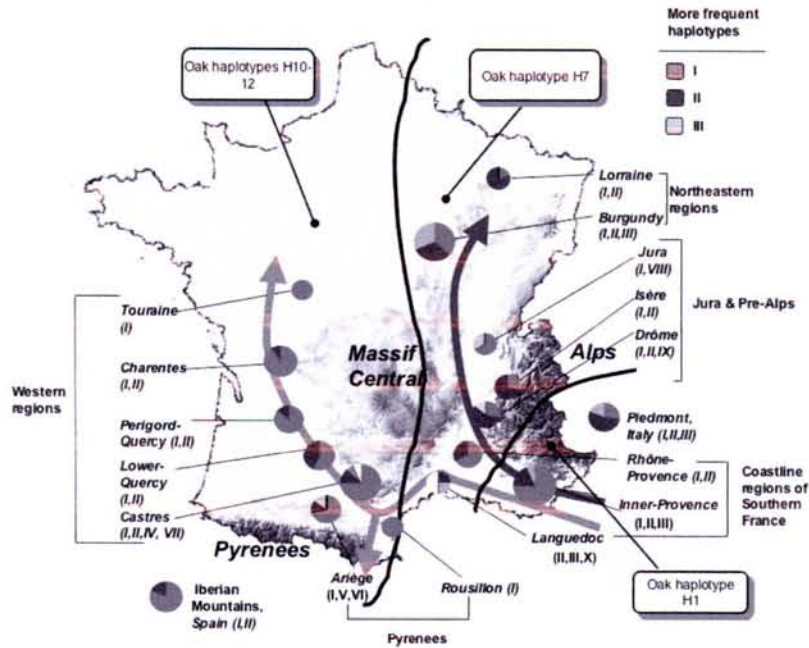


Figure 26. Distribution des 10 haplotypes ITS de *T. melanosporum* dans les 17 populations analysées (Fig. 2 du paragraphe 2.1).

À partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que les populations de *T. melanosporum* auraient trouvé refuge dans les forêts de l'Espagne ou de l'Italie. Malheureusement, nous ne disposons pas d'un échantillonnage couvrant le sud de l'Italie et de l'Espagne pour savoir exactement quels ont été les refuges de cette truffe durant les glaciations. Alors, pourquoi avons-nous plutôt pensé à l'Italie? Et bien, dans la population piémontaise (Italie) analysée, nous avons retrouvé les trois haplotypes les plus fréquents ; cette observation nous a conduit à considérer l'Italie comme possible refuge. Toutefois, nous n'avons pas de preuves expérimentales pour étayer cette hypothèse. Nous avons aussi suggéré que la truffe aurait recolonisé la France, en suivant les chênes, à partir de cette population italienne et ceci par deux voies principales : la voie de la vallée du Rhône et la voie de l'Atlantique. Mais existe-t-il d'autres scénarii possibles ? Effectivement, nous pouvons imaginer que la Truffe aurait trouvé refuge en Italie mais aussi en Espagne et que les deux lignées françaises résultent de la recolonisation à partir de ces deux refuges. Dans ce cas, il existe plusieurs possibilités :

1- Les populations espagnoles et italiennes sont composées des mêmes haplotypes (I et II). La voie de l'Atlantique (Ouest de la France) correspondrait à la recolonisation par la population espagnole et la voie de la vallée du Rhône à la recolonisation par la population italienne. L'haplotype III proviendrait de la population italienne.

2- L'Haplotype I proviendrait des populations espagnoles et les haplotypes II et III des populations italiennes. Dans ce cas, il faudrait que la population espagnole recolonise l'Italie, or, à ma connaissance, il n'existe pas d'exemple d'une telle voie. Par contre, la colonisation de l'Espagne par l'Italie a été suggérée pour les Chênes (Petit et al. 2000a ; Petit et al. 2000b ; Petit et al., 2003).

Seule une analyse d'un grand nombre d'échantillons de ces zones géographiques permettrait de vérifier notre hypothèse.

Qu'en est-il pour les autres espèces de Tuber ?

Peut-être plus que *T. melanosporum*, *T. magnatum* est une espèce qui a de fortes exigences environnementales (cf § 1.2.2) et son niveau de diversité génétique est aussi très faible (cf. §1.4.3). Il est donc probable que cette truffe ait aussi subi une forte diminution démographique lors d'une récente glaciation suivie par une recolonisation lors du réchauffement climatique. Mais, à la différence de *T. melanosporum*, elle n'aurait pas franchi les Alpes. Sa présence dans les pays de l'Europe de l'Est (Slovénie, Croatie, Hongrie...) peut être expliquée par une recolonisation à partir de l'Italie, ou bien par la persistance d'une population dans les Balkans. Les échantillons Croates étudiés présentent deux haplotypes pour le locus A21inf aussi trouvés en Italie (cf. § 2.2). En revanche, il existe un haplotype 3 de l'ITS leur étant spécifique (cf. § 2.2). Toutefois, ces résultats ne permettent pas de déterminer laquelle des deux hypothèses énoncées précédemment est la bonne. Il faudrait analyser un grand nombre d'échantillons, provenant de tous les pays producteurs, pour savoir si *T. magnatum* a pris refuge en Italie ou bien en Italie et dans les Balkans.

Comme je l'ai dit au paragraphe 1.4.3, il existe des espèces de truffes ayant une plus forte variabilité génétique, c'est le cas de *T. borchii*, *T. uncinatum*, *T. maculatum*. Le fait que ces espèces soient trouvées dans le Nord de l'Europe, montre qu'elles résistent mieux au froid et au gel hivernaux. Il est donc probable que les modifications de température du Quaternaire ont eu moins d'effet sur elles. Nous pouvons aussi imaginer que l'effet « *bottleneck* » aurait été moins important et qu'elles auraient pris refuge non seulement dans le Sud de l'Europe, mais aussi dans plusieurs régions du Nord de l'Europe. Ceci expliquerait leur plus grand niveau de diversité génétique. Toutefois, il n'existe encore aucune étude de la structure génétique de ces espèces sur l'ensemble de leur aire de répartition et donc nous ne pouvons que spéculer sur leur histoire.

La mise en évidence d'un niveau de structuration génétique significatif pour *T. melanosporum* et *T. magnatum* remet en cause la théorie expliquant les différences phénotypiques (qualités organoleptiques) par les conditions pédoclimatiques (effet « terroir ») en excluant d'éventuelles variations génétiques (« inné ») (Bertault et al., 1998). L'existence d'un polymorphisme de l'ITS permettra le développement d'outils de diagnostics moléculaires aptes à identifier l'origine géographique des truffes et, ainsi le développement de normes, telles que l'Appellation d'Origine Géographique Contrôlée (AOC).

3.2 Analyse d'une truffière de *T. magnatum*

T. magnatum est la truffe la plus chère au monde, mais contrairement à *T. melanosporum* sa culture n'est pas encore maîtrisée (cf. § 1.2.3.2). Il est donc fondamental de mieux connaître l'écologie des truffières afin d'en améliorer la gestion et éventuellement espérer maîtriser sa culture. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étudier la communauté ectomycorhizienne d'une truffière de *T. magnatum*. En effet, la compétition entre espèces mycorhiziennes est un facteur majeur des processus de mycorhization contrôlée. Par exemple, de nombreuses truffières artificielles de *T. melanosporum* sont contaminées par d'autres espèces comme *T. brumale* (cf. §1.2.3.1). De même, *T. borchii* et *T. maculatum* sont souvent récoltés dans les expérimentations de plants mycorhizés par *T. magnatum* (cf. §1.2.3.2). Pour cela, des ascocarpes de *T. magnatum* ont été récoltés durant cinq saisons dans une truffière naturelle (Montemagno, Asti). Nous avons aussi échantillonné des apex racinaires en Novembre 2001 et Mai 2002 dans des zones productives et non productives de la truffière.

3.2.1 La diversité génétique au sein de la truffière

Au début de cette étude nous ignorions la diversité génétique au sein de la population de *T. magnatum* occupant cette truffière: (i) Existe-t-il un ou plusieurs génotypes et quelle est leur distribution dans la truffière ?; (ii) Le mycélium de ces génotypes se déplace-t-il dans la truffière ?

Lors de l'analyse d'une truffière artificielle de *T. melanosporum*, Bertault et al. (2001) ont identifié jusqu'à six génets autour d'un arbre. Même si la truffière a été étudiée durant deux années successives, aucune information sur l'évolution des génets lors de ces deux saisons n'a été fournie. Ces auteurs ont utilisé une approche multi locus (RAPD), mais aussi simple locus avec l'analyse de loci microsatellites. Ces deux types de marqueurs

se sont montrés polymorphes au sein de la population de la truffière. Le séquençage direct d'une région génomique de *T. magnatum* (SCR-A21inf ; cf. §2.2) a permis d'identifier deux génotypes. Ceux-ci sont toujours trouvés dans la même zone de la truffière, ce qui indique une certaine stabilité. Toutefois, nous ne savons pas combien d' « individus » de *T. magnatum* il existe, puisque nous n'avons qu'un seul locus polymorphe. Afin de répondre à cette question, il aurait fallu utiliser une technique multilocus comme la RAPD ou l'AFLP. Nous avons décidé de ne pas mener ce type d'analyse pour deux raisons :

- 1- Nous ne disposions que d'ADN stocké depuis plusieurs années, or il semble que ce type d'ADN ne soit pas utilisable pour ces techniques car il est dégradé et produit des bandes polymorphes artéfactuelles.
- 2- Nous voulions mettre au point des marqueurs co-dominants et spécifiques pouvant être utilisés sur l'ADN extrait de mycorhizes et de l'ADN du sol.

Nous avons donc mis au point une analyse permettant de suivre l'évolution d'une population à l'échelle micro-géographique. Dans le futur, nous souhaiterions utiliser ce marqueur polymorphe (SCAR-A21inf) sur l'ADN extrait de mycorhizes, mais aussi et surtout sur des extraits d'ADN de sol.

3.2.2 Que se passe-t-il dans le sous-sol de la truffière ?

Identification de mycorhizes de *T. magnatum*

Les deux seules publications traitant de l'identification moléculaire de mycorhizes de *T. magnatum* sont celles de Mello et al. (2001) et Rubini et al. (2001). Toutefois, ces mycorhizes sont retrouvées uniquement sur les plants élevés dans des conditions contrôlées (pépinière). Lorsque les plants sont transférés dans la nature, les mycorhizes de cette truffe ne sont plus détectées. Ces auteurs expliquent cette absence par une faible compétitivité de *T. magnatum* par rapport aux autres espèces mycorhiziennes. En fait, notre connaissance sur la période pendant laquelle *T. magnatum* produit des mycorhizes, sur leur répartition, sur leur fréquence et sur leur dynamique temporelle est très limitée.

Nous avons identifié deux morphotypes correspondant à *T. magnatum* lors de l'échantillonnage de Mai 2002 une période pendant laquelle le mycélium ne produit pas de fructifications (période non productive). Par contre, nous n'en avons pas détecté pendant une période productive (Novembre 2001). En fait, l'autonomie nutritionnelle de l'ascocarpe a déjà été proposée pour *T. melanosporum* (cf. §1.3.3.2 ; Callot, 1999). Toutefois, la présence de

mycorhizes en Mai est intéressante puisqu'il s'agit de la période pendant laquelle se forment les fructifications. Elles pourraient être fondamentales pour la formation du corps fructifère, en leur donnant par exemple l'énergie nécessaire. Malheureusement, nous ne disposons pas de systèmes expérimentaux permettant d'étudier la formation des ascocarpes et de voir quels sont les facteurs conduisant à leur apparition.

Biodiversité ectomycorhizienne au sein de l'écosystème truffier

Les espèces ectomycorhiziennes majoritaires dans le sous-sol de la truffière de Montemagno appartiennent aux *Telephoraceae*, *Pezizales* et *Sebacina*. À ma connaissance, il n'existe pas dans la littérature d'études de la biodiversité ectomycorhizienne d'un écosystème truffier similaire. Si Rossi et al. (2002) identifient des morphotypes *Tuber-like* dans une truffière de *T. magnatum* du centre Italie, ils n'ont pas confirmé l'appartenance de ceux-ci par séquençage de l'ITS. Dans une analyse morphologique d'apex mycorhiziens prélevés dans plusieurs truffières de *T. melanosporum* espagnoles, De Miguel et al. (2002) identifient plusieurs espèces de *Tuber* et de *Tomentella*.

Il semble donc que les Telephoraceae et les Pezizales soient parmi les taxa dominants de l'écosystème truffier.

En fait, plusieurs études montrent que les *Russulaceae* et les *Telephoraceae* sont parmi les taxa ectomycorhiziens les plus répandus dans les communautés de conifères européens et Nord américains (Taylor et Bruns, 1998 ; Jonsson et al., 1999 ; Horton et Bruns, 2001). Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse indiquent que les *Telephoraceae* sont aussi abondants dans les communautés du sud de l'Europe composées de peupliers et de chênes. Parmi ceux-ci, les *Tomentella* sont les espèces les plus abondamment identifiées. Elles forment des fructifications souvent trouvées au niveau de débris végétaux et de la litière, ceci avait fait penser que ces champignons étaient saprotrophes (Larsen, 1971). Leurs fructifications sont cachées et tendent donc à être ignorées lors d'études basées sur la récolte des carpophores, ceci contribue à augmenter les discordances entre le prélèvement des fructifications et des mycorhizes. Pour le moment, nous ne savons pas pourquoi ces champignons sont aussi abondants dans les communautés ectomycorhiziennes, mais il est possible qu'ils soient de bons compétiteurs et qu'ils jouent un rôle clef dans le fonctionnement des écosystèmes (Horton et Bruns, 2001).

En ce qui concerne les *Sebacina*, cette famille était encore négligée comme espèce ectomycorhizienne jusqu'à récemment (Agerer 1987-1998 ; Smith et Read, 1997). Actuellement, les *Sebacina* sont reconnues comme formant des symbioses ectomycorhiziennes avec les arbres et les

orchidées (Urban et al., 2003 ; Selosse et al., 2002). Lors de l'étude de la communauté ectomycorhizienne associée à *Eucalyptus marginata* en Australie, Glen et al. (2002) montrent que les *Sebacina* sont abondants dans ce type d'écosystème.

Ces résultats indiquent qu'il existe des similitudes entre les communautés ectomycorhiziennes d'écosystèmes différents (Europe, Amérique et Australie) et que les espèces dominantes appartiennent souvent aux mêmes taxa (par exemple Telephoraceae et Sebacina).

Comme je l'ai déjà évoqué dans le paragraphe 1.3.1, nous ne connaissons pas la distribution du mycélium de truffes dans le sous-sol des truffières. Étant donné que les truffes ne forment pas de rhizomorphes et que leur culture *in vitro* n'est pas aisée, la seule technique pouvant être utilisée pour connaître la distribution du mycélium truffier est l'analyse d'extrait d'ADN provenant de sols. Cette technique a été utilisée avec succès pour étudier la biodiversité ectomycorhizienne dans des extraits de sols (Landeweert et al., 2003), mais aussi la répartition d'un champignon ectomycorhizien, *Hebeloma cylindrosporum* (Guidot et al., 2001, 2002, 2004 ; cf. § 1.4.1.2). C'est pourquoi, lors de ce travail de thèse, j'ai commencé l'analyse du sol de la truffière de Montemagno afin d'essayer d'avoir une image de la répartition de *T. magnatum* dans le sous-sol. Pour le moment, je suis parvenu à obtenir des extraits d'ADN amplifiable avec les amorces universelles ITS1f-ITS4. En revanche, il reste à améliorer les conditions d'amplification de ces extraits d'ADN avec des amorces spécifiques de *T. magnatum*.

En conclusion, les truffières sont des écosystèmes complexes pour lesquels nous avons encore peu de données. Il apparaît fondamental de mieux les connaître afin d'améliorer la culture de ces produits naturels dont la production a fortement décliné.

3.3 Limites rencontrées par l'analyse de *T. melanosporum* et *T. magnatum* et conséquence pour la filière truffe

Comme je l'ai évoqué tout au long de ce manuscrit, *T. melanosporum* et *T. magnatum* sont des espèces économiquement importantes. Ceci rend leur analyse intéressante, mais est aussi à l'origine de nombreux problèmes :

- 1- Leur coût entraîne pour l'analyse d'un ample échantillonnage un investissement financier important.

- 2- D'autre part, il est souvent difficile lors d'une analyse de diversité génétique macro-géographique d'avoir des informations précises sur le lieu de récolte, pourtant ces données sont nécessaires pour ce type d'étude.
- 3- Lors des prélèvements d'apex racinaires et de sol dans les truffières, il est impossible de réaliser un ample échantillonnage et les prélèvements en période productive sont souvent difficiles à obtenir.

Ces problèmes conduisent à penser que même si ces deux espèces sont les plus intéressantes d'un point de vue économique et social (cf. §1.2.1), ce ne sont sûrement pas les meilleurs candidats pour les études de diversité génétique et de génétique des populations. En effet, lors de telles analyses macro-géographiques nous avons besoin d'un grand nombre d'échantillons pour lesquels nous devons connaître avec précision les sites de récolte ainsi que les caractéristiques écologiques dans lesquelles elles sont récoltées (hôte, altitude...etc.). Dans le cas de *T. melanosporum*, 80 % de la production actuelle française provient de truffières artificielles (cf. §1.2.3.1). Il faut donc faire attention et ne pas se limiter qu'aux échantillons dont l'origine est connue. Il en est de même pour l'analyse des truffières. Comme nous l'avons constaté, notre travail est limité par le nombre d'échantillons. Il serait donc plus simple d'échantillonner une truffière naturelle d'une espèce moins prestigieuse mais tout aussi intéressante du point de vue biologique

Malgré ces limites, nous sommes parvenus à obtenir des résultats intéressants pour la filière truffe. Tout d'abord, la mise en évidence d'une structure génétique non négligeable pour *T. melanosporum* et *T. magnatum* est un premier pas vers la réalisation d'Appellations d'Origines Contrôlées (AOC). D'autre part, nous montrons que le choix des inoculum pour la réalisation de plants truffiers ne peut être fait au hasard. En d'autres termes, il est souhaitable de prendre comme inoculum des souches provenant de la zone dans laquelle la plantation sera réalisée. Ceci pour deux principales raisons : (1) ne pas provoquer de flux géniques entre populations, ce qui conduirait à une homogénéisation de celles-ci et rendrait impossible la réalisation de marqueurs régionaux spécifiques et (2) ces souches étant indigènes, elles sont probablement mieux adaptées au microclimat existant.

Références de la discussion générale

- Agerer R (ed.) (1987-98) Colour Atlas of Ectomycorrhiza. Einhorn Verlag, Scwäbissch Gmünd.
- Bertault G., Raymond M., Berthomieu A., Callot G., Fernandez D., 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* 394, 734.
- Bertault G., Rousset F., Fernandez D., Berthomieu A. Hochberg, M. E., Callot G., Raymond M., 2001. Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* 86, 451-458.
- Brown D.D., Wensink P.C., Jordan E., 1972. A comparison of the ribosomal DNA's of *Xenopus laevis* and *Xenopus mulleri*: the evolution of tandem genes. *Journal Molecular Biology*, 63(1), 57-73
- Callot G. 1999. La Truffe, la Terre, la Vie. . INRA, Paris, 210 p.
- De Miguel A., De Roman M., Etayo M.L., 2002. Mycorrhizal fungi competing with *Tuber melanosporum* Vitt. In cultivated truffle beds in north-eastern Spain. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Douet J. P., Castroviejo M., Mabru D., Chevalier G., Dupre C., Bergougnoux F., Ricard J. M., Medina B., 2004. Rapid molecular typing of *Tuber melanosporum*, *T. brumale* and *T. indicum* from tree seedlings and canned truffles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (4), 668-673
- Dover G., 1982. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature*, 299, 111-117
- Elder J.F., Turner B.J., 1995. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Quart. Rev. Biol.*, 70, 297-320
- Frizzi G., Lalli G., Miranda M., Pacioni G., 2001. Intraspecific isoenzyme variability in Italian population of the white truffle *Tuber magnatum*. *Mycol Res* 105 (3), 365-369.
- Gandebœuf D., Dupré C., Roeckel-Drevet P., Nicolas P., Chevalier G., 1997. Typing *Tuber* ectomycorrhizae by polymerase chain amplification of the internal transcribed spacer of rDNA and the sequence characterized amplified region markers. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 723-728
- Glen M, Tommerup IC, Bougher NL, O'Brien PA 2002. Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests? *Mycorrhiza* 12 (5): 243-247.
- Glen M., Tommerup I.C., Bougher N.L., O'Brien P.A., 2001. Interspecific and intraspecific variation of ectomycorrhizal fungi associated with Eucalyptus ecosystems as revealed by ribosomal DNA PCR-RFLP. *Mycological research*, 105, 843-858
- Guidot A., Debaud J.C., Effosse A., Marmeisse R., 2004. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*, 161, 539-547
- Guidot A., Debaud J.C., Marmeisse R., 2001. Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology*, 10, 1121-1131
- Guidot A., Debaud J.C., 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, 477-486
- Hewitt, G. M. 1993. Hybrid zones and Evolutionary Process (ed. Harrison, R. G.) 140-164 (Oxford Univ. Press, Oxford). Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907-913.
- Horton T.R., Bruns T.D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10, 1855-1871
- James T.Y., Moncalvo J.M., Li S., Vilgalys R., 2001. Polymorphism at the DNA spacers and its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. *Genetics* 157: 149-161
- Jonsson T, Kokalj S, Finley R, Erland S 1999. Ectomycorrhizal community structure in a limed spruce forest. *Mycol. Res.* 103 (4): 501-508.
- Landeweert R., Leeflang P., Kuyper T.W., Hoffland E., Rosling A., Wernars K., Smit E., 2003. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 327-333
- Lanfranco L., Delpero M., Bonfante P., 1999. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Molecular Ecology*, 8 (1), 37-45
- Lanfranco L., Wyss P., Marzachi C., Bonfante P. 1993. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. *FEMS Microbiol. Lett.*, 114, 245-25
- Larsen MJ (1971) The genus *Pseudotomentella* (Basidiomycetes, Thelephoraceae s.str.) *Nova Hedwigia*, 22: 599-619.

- Le Quéré A., 2004. *Genome and Transcriptome Analyzes in the Ectomycorrhizal Fungus Paxillus involutus*. PhD thesis, University of Lund, Sweden.
- Lowe A.J., Gillies A.C.M., Wilson J., Dawson I.K., 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology* 9 (7), 831-841
- Mabru D., Dupré C., Douet J. P., Leroy P., Ravel C., Ricard J. M., Medina B., Castroviejo M., Chevalier G., 2001. Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products : fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11 : 89-94.
- Mello, A., Fontana, A., Meotto, F., Comandini, O., Bonfante P., 2001. Molecular and morphological characterization of *T. magnatum* mycorrhizas in a long-term survey. *Microbiol Res* 155: 279-284.
- Murat C., 2001. Etude de la diversité génétique de la Truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vittad.). Diplôme d'Etude Approfondie, Université de Nancy.
- Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Topini F., Arcioni S., 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? *FEMS Microbiol. Lett.* 235 (1), 109-115
- Parkin et Butlin, 2004. Within- and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. *Molecular biology and evolution*, 21 (8), 1595-1601
- Pawlowska T.E, Taylor J.W, 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 427, 733-737
- Petit R.J., Latouche-Hallé C., Pemonge M.H., Kremer A., 2002a. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management* 156: 115-129.
- Petit RJ, Brewer S Bordacs *et al.*, 2002b. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- Mabru D., Douet J.P., Mouton A., Dupre C., Ricard J.M., Medina B., Castroviejo M., Chevalier G., 2004. PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial *Lsu-rDNA* as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and other truffle species in cans. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (1), 33-42
- Petit RJ, Aguinalgalde I, De Beaulieu JL, et al., 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Rossi I., Bertini L ; Amicucci A., Cecchini M., Gregori L., Sacchi A., Zambonelli A., Stocchi V., 2002. Study of a natural *Tuber magnatum* Pico truffière in central Italy. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, Ed. Hall, I.; Yun Wang; Danell, E.; Zambonelli, A., Christchurch, New Zealand, 3-6 July, 2001
- Roux, C., Séjalon-Delmas N., Martins M., Parguey-Leduc A., Dargent R., Bécard G., 1999. Phylogenetic relationships between european and chinese truffles based on parsimony and distance analysis of ITS sequences. *FEMS Microbiology Letters* 180 : 147-155.
- Rubini A., Topini F., Riccioni C., Paolocci F., Arcioni, S., 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in white truffle (*Tuber magnatum*). *Mol Ecol Notes* 4, 116-118.
- Santucci F., Emerson B.C., Hewitt G.M., 1998. Mitochondrial DNA phylogeography of European Hedgehogs. *Molecular Ecology*, 7, 1163-1172.
- Seddon J. M., Santucci F., Reeve N. J., Hewitt G. M., 2001. DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10 (9), 2187-2198
- Selosse M-A., Bauer R., Moyersoen B. (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist* 155: 183-195.
- Sinclair W. T., Morman J. D., Ennos., R. A., 1999. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology*, 8 (1), 83-88
- Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
- Taylor DL and Bruns TD 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Mol. Ecol.* 8: 1837-1850.
- Urban A., Weiß M., Bauer R. (2003) Ectomycorrhizas involving sebacinoid mycobionts. *Mycol Res* 107 (1): 3-14.
- Vollmer S., Palumbi S., 2004. Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology*, 13, 2763-27



Monsieur MURAT Claude

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1

en BIOLOGIE VEGETALE & FORESTIERE

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1023

Nancy, le 12 janvier 2005

Le Président de l'Université



Résumé

Les truffes sont des champignons ectomycorhiziens du genre *Tuber*. À cause de leurs qualités organoleptiques, certaines espèces de truffes ont une forte valeur économique, c'est le cas de *Tuber melanosporum* et *T. magnatum*. Malgré la multiplication des études, il persiste de nombreuses inconnues sur la biologie (par exemple: phylogéographie et l'écologie) de ces espèces.

L'analyse de la diversité génétique de *T. melanosporum* sur l'ensemble de son aire de répartition en France a mis en évidence un niveau de différenciation génétique non négligeable entre les populations de l'Est et de l'Ouest de la France. Une analyse phylogéographique a permis de suggérer deux voies de recolonisation post-glaciaire : la voie de la vallée du Rhône et la voie de l'Atlantique.

L'analyse des ascocarpes de *T. magnatum* récoltés dans une truffière naturelle a montré l'existence d'au moins deux génotypes dans cette population. D'autre part, la récolte d'apex mycorhiziens indique que les ectomycorhizes de *T. magnatum* sont très rares (deux morphotypes sur 39). Les espèces ectomycorhiziennes majoritaires appartiennent aux *Telephoraceae*, *Pezizales* et *Sebacina*.

Mots clefs : *T. melanosporum*, *T. magnatum*, populations, phylogéographie, diversité

Abstract

Truffles are ectomycorrhizal fungi belonging to *Tuber*. Fructifications of some species, such as *T. melanosporum* and *T. magnatum*, are appreciated by consumers and have important economic value. Despite of numerous studies, some aspects of truffle biology (i.e. phylogeography and ecology) are unknown.

Wide range analysis of genetic diversity in *T. melanosporum* showed important genetic differentiation between East and West French populations. Phylogeographic analysis allowed us to hypothesis that *T. melanosporum* recolonized France by two main routes : Rhône Valley route and Atlantic route.

T. magnatum ascocarps analysis in a natural truffle ground identified at least two genotypes in this population. In order to characterize *T. magnatum* mycorrhizosphere, root tips have been harvested. We found that *T. magnatum* ectomycorrhizas are very rare (two out of 39 morphotypes). Moreover, more abundant species belong to *Telephoraceae*, *Pezizales* and *Sebacina*.

Keywords: *T. melanosporum*, *T. magnatum*, populations, phylogeography, diversity