

Annexes

1°) Annexes relatives au chapitre « Matériel & méthodes »

1.1 °) Terrain (août – septembre 2006)

Annexe 1

Le tableau a.1 ci-dessous détaille la localisation géographique des souches que j'ai personnellement collectées.

n° MUCL 47777	<i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] localisation : China, Jiangsu, Nanjing, Zhongshan Ling habitat : Forêt secondaire, sur <i>Robinia sp.</i> identifié et collecté avec l'aide de C. Decock et Y.-C. Dai
n° MUCL 47780	<i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] localisation : China, Jiangsu, Nanjing, Zhongshan Ling habitat : Forêt secondaire, à la base du tronc d'un <i>Robinia sp.</i> (vivant) identifié et collecté avec l'aide de C. Decock et Y.-C. Dai
n° MUCL 47781	<i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] localisation : China, Jiangsu, Nanjing, Zhongshan Ling habitat : Forêt secondaire, à la base du tronc d'un <i>Robinia sp.</i> (vivant) identifié et collecté avec l'aide de C. Decock et Y.-C. Dai
n° MUCL 47981	<i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] localisation : Belgium, Brabant Wallon, Louvain-la-Neuve habitat : Jardin entourant le campus, à la base du tronc d'un <i>Robinia pseudoacacia</i> (vivant) identifié et collecté avec l'aide de C. Decock, en compagnie de Mario Amalfi (mémorant)

Tableau a.1. Localisation géographique des souches que j'ai personnellement collectées

Annexe 2

Le tableau a.2 ci-dessous détaille la localisation géographique des souches que je n'ai pas personnellement collectées.

n° MUCL 38825 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of collecting : --1991 Identifier 1. Chang T. Geographic location: Taiwan, Chia-I County Substratum/Host: living stem and root, Citrus sp.
n° MUCL 38828 <i>Perenniporia formosana</i> Chang [F/teleomorph] Date of collecting : -Jun-1992 Identifier 1. Chang T. Geographic location: Taiwan, Taichung, Tung-shih Substratum/Host: dead trunk, <i>Prunus mume</i>
n° MUCL 39725 <i>Perenniporia formosana</i> Chang [F/teleomorph] Taxonomic name Date of receipt : 13-03-1996
n° MUCL 39825 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of receipt : 1-1-1996 Geographic location: UK Substratum/Host: <i>Robinia pseudoacacia</i>

<p>n° MUCL 40031 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarde n [F/teleomorph] Date of collecting : --1996 Identifier 1. Maunce I. Geographic location: Canada, Quebec, Golf Course (Dixie) Substratum/Host: tissue culture from sporophore, <i>Ulmus sp.</i></p>
<p>n° MUCL 40033 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarde n [F/teleomorph] Date of receipt : 01-09-1996 Substratum/Host: rot, <i>Fraxinus sp.</i></p>
<p>n° MUCL 40042 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarde n [F/teleomorph] Date of receipt : 01-01-1996 Identifier 1. Decock C. Geographic location: USA, Virginia</p>
<p>n° MUCL 40044 <i>Perenniporia robinophila</i> (Murrill) Ryvarde n [F/teleomorph] Date of receipt : 01-09-1996</p>
<p>n° MUCL 40485 <i>Vanderbylia ungulata</i> Reid [F/teleomorph] Received as <i>Perenniporia sp.</i> Date of collecting : 16-Jan-1996 Identifier 1. Decock C. Habitat : <i>Brachystegia</i> forest Geographic location: Zimbabwe, Matabeleland North, Victoria Falls area Substratum/Host: living tree</p>
<p>n° MUCL 41397 <i>Perenniporia latissima</i> (Bresadola) Ryvarde n [F/teleomorph] Date of collecting : -Sep-1998 Identifier 1. Decock C. Habitat : rain forest Geographic location: Singapore, Bukit Timah Nature Reserve Substratum/Host: dead trunk, <i>Shorea sp.</i></p>
<p>n° MUCL 41425 <i>Vanderbylia sinensis</i> Decock [F/teleomorph] Received as <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarde n Date of collecting : -Aug-1998 Identifier 1. Decock C. Habitat : garden Geographic location: China, Beijing Substratum/Host: living trunk, <i>Populus sp.</i></p>
<p>n° MUCL 41564 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarde n [F/teleomorph] Isolator 1. Decock C. Date of isolating : --1999 Geographic location: Netherlands Substratum/Host: <i>Fagus sylvatica</i></p>
<p>n° MUCL 44779 <i>Vanderbylia vicina</i> (Lloyd) Reid [F/teleomorph] Date of collecting : 28-Jul-2003 Identifier 1. Decock C. Habitat : dry afro montane forest</p>

Geographic location: Ethiopia, Oromea Reg., (former Shoa Prov.), Wondogenet forest Substratum/Host: dead fallen trunk, undetermined angiosperm
n° MUCL 44782 <i>Vanderbylia vicina</i> (Lloyd) Reid [F/teleomorph] Date of collecting : 28-Jul-2003 Identifier 1. Decock C. Habitat : dry afro-montane forest Geographic location: Ethiopia, Oromea Reg., (former Shoa Prov.), Wondogenet forest Substratum/Host: dead stump, undetermined angiosperm
n° MUCL 45417 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of receipt : 01-01-2004 Collector 1. Castillo G.
n° MUCL 45888 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of collecting : 1-Nov-1992 Identifier 1. Decock C. Habitat : <i>Quercus-Castaneus</i> forest Geographic location: France, Dordogne, Domme Substratum/Host: dead trunk, <i>Quercus sp.</i>
n° MUCL 45904 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of collecting : 23-Jul-1994 Identifier 1. Decock C. Geographic location: Korea, Seoul, Kwan-ak Mt.
n° MUCL 45965 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of collecting : -Sep-2004 Identifier 1. Decock C. Geographic location: France, Dordogne
n° MUCL 45966 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of collecting : -Sep-2004 Identifier 1. Decock C. Geographic location: France, Dordogne
n° MUCL 46058 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of receipt : 06-10-2004 Geographic location: Chine
n° MUCL 46059 <i>Vanderbylia sinensis</i> Decock [F/teleomorph] Received as <i>Perenniporia gr. fraxinea</i> Date of receipt : 01-01-2004 Identifier 1. Decock C.
n° MUCL 46183 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of receipt : 01-01-2004 Geographic location : Corée
n° MUCL 46185 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvarden [F/teleomorph] Date of receipt : 01-01-2004 Geographic location : Corée

<p>n° MUCL 46928 <i>Vanderbylia</i> sp. [F/teleomorph] Date of collecting : -Aug-2005 Identifier 1. Decock C. Geographic location: China</p>
<p>n° MUCL 46931 <i>Vanderbylia</i> sp. [F/teleomorph] Date of collecting : -Aug-2005 Identifier 1. Decock C. Geographic location: China</p>
<p>n° MUCL 47003 <i>Perenniporia gr. fraxinea</i> [F/teleomorph] Date of collecting : 24-Aug-2005 Identifier 1. Decock C. Habitat : garden Geographic location: China, Beijing Province, near the Fragrant Hill Park Substratum/Host: base of a living trunk, <i>Robinia</i> sp.</p>
<p>n° MUCL 47459 <i>Perenniporia latissima</i> (Bresadola) Ryvar den [F/teleomorph] Date of collecting : 08-Apr-2006 Identifier 1. Decock C. Habitat : rain forest Geographic location: Gabon, Ogooué-Ivindo, Parc National de l'Ivindo, Réserve intégrale d'Ipassa, Koungou Falls, near the camp Substratum/Host: dead fallen trunk, angiosperm</p>
<p>n° MUCL 47466 <i>Vanderbylia</i> sp. [F/teleomorph] Date of collecting : 10-Apr-2006 Identifier 1. Decock C. Habitat : rain forest Geographic location: Gabon, Ogooué-Ivindo, Parc National de l'Ivindo, Réserve intégrale d'Ipassa, Ipassa Biological Station, layons 7 & 8 Substratum/Host: dead fallen trunk, unidentified angiosperm</p>
<p>n° MUCL 47633 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Date of collecting : 23-Jul-1991 Identifier 1. Hattori T. Geographic location: Japan, Kyoto Prefecture, Kyoto, Kiyomizuyama</p>
<p>n° MUCL 47692 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Date of collecting : 23-Sep-1969 Geographic location: United States, New York, Jamesville (Greenlake) Substratum/Host: <i>Acer</i> sp.</p>
<p>n° MUCL 47693 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Depositor 1. Nakasone K. Date of collecting : 06-Aug-1991 Geographic location: United States, Wisconsin, Madison (Picnic Point) Substratum/Host: living trunk, <i>Fraxinus</i> sp.</p>
<p>n° MUCL 47694 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Depositor 1. Nakasone K.</p>

<p>Date of collecting : 14-Aug-1931 Geographic location: United States, Louisiana, Kilbourne Substratum/Host: <i>Nyssa sylvatica</i></p>
<p>n° MUCL 47695 <i>Perenniporia robiniophila</i> (Murrill) Ryvar den [F/teleomorph] Depositor I. Nakasone K. Date of collecting : 19-Sep-1970 Geographic location: United States, Maryland, Oxon Hill (Vance Residence) Substratum/Host: fruiting at base, <i>Robinia pseudoacacia</i></p>
<p>n° MUCL 47696 <i>Perenniporia robiniophila</i> (Murrill) Ryvar den [F/teleomorph] Depositor I. Nakasone K. Date of collecting : 16-Sep-1928 Geographic location: United States, Washington Substratum/Host: heart rot, <i>Robinia pseudoacacia</i></p>
<p>n° MUCL 47981 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Date of collecting : 01-Oct-2006 Identifier I. Decock C. Habitat : garden Geographic location: Belgium, Brabant Wallon, Louvain-la-Neuve Substratum/Host: base of a living trunk, <i>Robinia pseudoacacia</i>, robinier faux-acacia</p>
<p>n° MUCL 47982 <i>Perenniporia fraxinea</i> (Bulliard : Fries) Ryvar den [F/teleomorph] Date of collecting : -Aug-2006 Identifier I. Decock C. Habitat : garden Geographic location: Japan, Tsukuba, Forestry and Forest Products Research Institute Campus Substratum/Host: base of a living trunk, <i>Robinia pseudoacacia</i>, robinier faux-acacia</p>
<p>n° MUCL 49131 <i>Perenniporia latissima</i> (Bresadola) Ryvar den [F/teleomorph] Date of receipt : 03-Jan-2007 Geographic location: Japan</p>
<p>n° MUCL 49132 <i>Perenniporia sp.</i> [F/teleomorph] Date of receipt : 3-Jan-2007 Geographic location: Japan</p>
<p>n° MUCL 49133 <i>Perenniporia latissima</i> (Bresadola) Ryvar den [F/teleomorph] Date of receipt : 3-Jan-2007 Geographic location: Japan</p>

Tableau a.2. Localisation géographique des souches que je n'ai pas personnellement collectées et qui ont été utilisées lors des expériences

1.2°) Le concept biologique

Annexe 3

Le milieu MA2 (malt agar 2%) [catalogue MUCL, 1998]

- Dans un Erlen d'un litre, mettre 10g de malt extract, 500ml d'eau distillée.
- Amener à pH 7.0 à l'aide de KOH (1M).
- Ajouter ensuite 7.5g d'agar.
- Mettre à l'autoclave (15 minutes à 121°C) pour stériliser le milieu (Fedegari autoclavi SPA).

- Ensuite, laisser refroidir jusqu'à 45°C (dans un four ou un bain à température fixée par exemple) et couler les milieux (sur boîtes de pétri stérilisées) à proximité d'un bec bunsen.

1.3°) Le concept phylogénétique

Annexe 4

A. 4.1. Préparation du matériel biologique

L'extraction d'ADN peut se faire à partir de souches d'herbiers, de mycélium frais sur milieu liquide ou de mycélium lyophilisé ayant poussé sur milieu liquide. La marche à suivre pour chacune de ces possibilités se trouve en annexe 5.

- Les herbiers
Avec une lame de rasoir, découper de petits morceaux du carpophore, de préférence du côté des tubes pour avoir des spores (celles-ci sont potentiellement vivantes et contiennent donc plus d'ADN que les couches anciennes du carpophore). Hacher ces morceaux le plus finement possible et les transférer dans l'Eppendorf d'extraction. Commencer l'extraction jusqu'à l'ajout de tampon d'extraction (voir ci-dessous) et laisser reposer deux à sept jours selon la date de récolte de l'herbier. L'extraction sera d'autant plus lente et difficile que l'herbier est ancien. Rajouter du tampon une à deux fois par jour selon la quantité qui a été absorbée par le matériel biologique.
- Le mycélium frais
A partir du mycélium sur boîte de MA2, déposer un implant dans un Erlen de milieu MA2 liquide. Le milieu liquide se prépare exactement comme le milieu solide sur boîte mais il ne contient pas d'agar et est coulé en petits Erlen de 100ml. Le mycélium pousse sur un plateau rotatif (Edmund Bühler VKS-75 control) à 105 tours / min durant environ deux semaines. On peut réaliser l'extraction à partir du moment où il y a suffisamment de matériel biologique pour remplir un Eppendorf de 2 ml.
A la lumière d'un bec bunsen, à l'aide d'une pince (passée à l'éthanol et à la flamme), prélever les billes de mycélium et les introduire dans l'Eppendorf.
- Le mycélium lyophilisé
Les billes de mycélium qui ont poussé sur milieu liquide peuvent être transférées dans un Falcon et lyophilisées (Virtis Sentry Bench Top 3L). La poudre obtenue après quarante-huit heures est transférée dans un Eppendorf à l'aide d'une petite spatule stérilisée.

Annexe 5

A.5.1. Extraction d'ADN

Les extractions ont toutes été réalisées à l'aide du kit « Invisorb Spin Plant Mini Kit » (proposé par Invitex GmbH).

1. Préparer les tubes de 2ml avec les billes de disruption (billes de céramique de 1mm de diamètre, en mettre sur 0.5 cm de hauteur). Broyer le matériel en lui faisant subir 2 fois 6000 rotations / min durant 30 secondes (utilisation du MagNa Lyser).
2. Ajouter 400µl de Lysis Buffer P et 20µl de protéinase K Mélanger et mettre 30 secondes à 65°C (utilisation du thermo bloc Grant).
3. Ajouter 4µl de RNA A (100mg/ml), mélanger et incuber 5 minutes à température ambiante.
4. Centrifuger 5 minutes à $13 \cdot 10^3$ tours / min (utilisation de la centrifugeuse Eppendorf 5415R). Récupérer le surnageant dans un tube Eppendorf de 1.5 ml
5. Ajouter 200µl de Binding Buffer P et mélanger avec la pipette.
6. Assembler les colonnes de filtration et transférer la suspension dans la colonne. Incuber une minute sur table. Centrifuger une minute à $12 \cdot 10^3$ tours / min. Eliminer le filtrat et replacer la colonne sur le tube collecteur.
7. Ajouter 550µl de Wash Buffer I et centrifuger une minute à $12 \cdot 10^3$ tours / min. Placer la colonne sur un nouveau tube collecteur.

8. Ajouter 550µl de Wash Buffer II et centrifuger 1 minutes à $12 \cdot 10^3$ tours / min. Eliminer le filtrat et replacer la colonne sur le tube collecteur. Ajouter 400µl de Wash Buffer II et centrifuger 2 minutes à $12 \cdot 10^3$ tours / min. Eliminer le filtrat et placer la colonne sur le tube d'élution de 1.5 ml.
9. Eluer l'ADN avec 150µl d'eau biomol (eau distillée stérilisée) préalablement chauffée à 65°C. Incuber 3 minutes sur table. Centrifuger une minute à 10^4 tours / min. L'ADN se trouve dans le filtrat.

Vérifier la qualité de l'extraction au spectrophotomètre (Biophotomètre Eppendorf).

Noter la concentration (en µg / ml), l'absorbance à 260nm (elle ne doit pas valoir 0.00x), le rapport des absorbances à 260 / 280nm (doit être proche de 1.8) et l'absorbance à 320 (doit être proche de 0 pour assurer la pureté).

Annexe 6

A.6.1. PCR

Le mélange réactionnel qui contient les substances nécessaires à la réaction PCR est préparé sur glace. Il est conseillé de faire un seul mélange et de le répartir ensuite dans les mini Eppendorf qui contiendront chacun l'ADN d'une souche différente de champignon.

Chaque mini Eppendorf contient 50µl de volume réactionnel :

- 28.5 µl d'eau
- 5 µl de Buffer (10X, concentration finale : 1X)
- 3µl de MgCl₂ (25mM, concentration finale : 3.5mM)
- 1µl de dNTP (10mM de chaque nucléotide, concentration finale : 200µM)
- 1µl de l'amorce forward (10µM, concentration finale : 0.1µM)
- 1µl de l'amorce reverse (10µM, concentration finale : 0.1µM) (tableau a.3)
- 0.5µl de Taq polymérase (5 unités / µl, concentration finale : 0.05 unités/µl) (tableau a.3)
- 10µl d'ADN (10µl d'eau pour le témoin négatif) (10ng/µl, concentration finale : 200pg/µl)

Nom de l'amorce	Séquence (5' -> 3')	référence
NS7 (ITS)	GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC	Symoens f. & al. (2000)
I4 (ITS)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White & al. (1990)
EF 595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG	Maphosa & al. (2006)
EF 1160R	CCGATCTTGTAGACGTCCTG	
LR0R (28 S)	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys R. & Hester (1990)
LR6 (28 S)	CGCCAGTTCTGCTTACC	
fRPB2-5F (RPB2)	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Matheny B. (2006)
bRPB2-7.1R (RPB2)	CCCATRGCYTYTTMCCCATDGC	

tableau a.3. Nature des amorces utilisées pour les différents types de PCR

Dès que les mélanges réactionnels sont terminés, transférer les minis Eppendorf dans la machine (Peltier Thermal Cycler – 200 ou Biometra T gradient) qui accomplira les cycles de variation de température (tableau a.4).

Nature de la PCR	Etape	Température	Temps
ITS	1	94.0 °C	3 min
	2	94.0 °C	1 min 30 sec
	3	55.0 °C	1 min 30 sec
	4	72.0 °C	2 min
		retour au point 2 (29 x)	
	5	72.0 °C	10 min
	6	15.0 °C	∞
EF	1	92 °C	5 min
	2	92 °C	30 sec
	3	52 °C	30 sec
	4	72 °C	1 min 30 sec
		retour au point 2 (39 x)	
	5	15 °C	∞
28S	1	94 °C	5 min
	2	94 °C	1 min
	3	50 °C	1 min 30 sec
	4	72 °C	4 min
		retour au point 2 (34 x)	
	5	72 °C	10 min
	6	15 °C	∞
RPB2	1	95 °C	4 min
	2	95 °C	1 min
	3	50 °C	1 min
	4	50 °C (↑ 0.3 °C / sec)	1 min 13
	5	72 °C	1 min
		retour au point 2 (34 x)	
	6	72 °C	10 min
	7	15 °C	∞

tableau a.4. Programme des températures pour la réaction PCR

Annexe 7

A.7.1. Electrophorèse

L'électrophorèse permet (dans une certaine mesure) de s'assurer que la réaction PCR a eu lieu et qu'il n'y a pas d'ADN contaminant. L'ADN, qui est chargé négativement, migre à travers un gel d'agarose grâce à l'influence d'un champ électrique.

1. Dans un Erlen de 200ml, mélanger 100ml de TAE 1x (tris acide acétique) et 1g d'agarose.
2. Chauffer au micro-onde afin d'homogénéiser la solution.
3. Lorsque la solution a une température telle que l'on peut tenir l'Erlen en mains, ajouter 30µl de BET (la prudence est de mise car ce produit est potentiellement cancérigène et mutagène !) ou 5µl de GelRed. Homogénéiser et couler la solution dans un récipient qui a la forme désirée du gel.
4. Peigner le gel pour retirer les bulles et fixer les peignes de manière à ce qu'ils forment des petites encoches une fois que le gel sera solidifié.
5. Préparer les produits PCR à la migration : mélanger 5µl de produit PCR et 5µl de bleu de charge 1x (sucrose et bleu de thymol). Cette substance permet de marquer le front de migration et entraîne les molécules d'ADN au fond des encoches du gel. Préparer 5µl d'échelle (DNA middle range fast runner), elle permet d'évaluer le nombre de paires de bases du fragment amplifié et d'ainsi repérer d'éventuels contaminants.

6. Une fois le gel solidifié, le transférer dans une cuve reliée à un générateur de courant. Mettre du tampon TAE 1X de manière à ce qu'il couvre la totalité du gel. Retirer les peignes. Ajouter 15µl de BET dans le tampon (sauf si vous utilisez le GelRed, bien entendu). Charger vos produits PCR.
7. Lancer la migration en allumant le générateur de courant (100 V, 200 mA, migration durant 18 minutes). Vérifier que le courant passe par l'apparition de petites bulles dans le tampon.

Annexe 8

A.8.1. Purification du produit PCR

J'ai utilisé le kit d'extraction d'Invisorb (MSB Spin PCRapace 500 proposé par Invitex GmbH).

1. Jeter les témoins (et, si c'est le cas, les Eppendorf correspond aux souches qui n'ont pas été amplifiées correctement).
2. Transfert du produit PCR dans des Eppendorf de 1.5ml
3. Ajouter 250µl de Binding Buffer et mélanger avec la pipette.
4. Assembler les colonnes sur les tubes receveurs de 2ml et transférer le mélange.
5. centrifuger 3 minutes à $12 \cdot 10^3$ tours / min.
6. Transférer les colonnes sur des tubes de 1.5ml.
7. Ajouter 50µl d'eau biomol, centrifuger une minute à 10^4 tours / minute.
8. La solution est prête pour le séquençage.

Annexe 9

A.9.1. Préparation des échantillons pour le séquençage

Préparer X x Y Eppendorf de 1.5ml (X étant le nombre de souches, Y étant le nombre d'amorces nécessaires). Chaque Eppendorf contient 3µl d'ADN purifié, 1µl de primer (tableau a.5) et 8µl d'eau biomol. Je ne me suis pas occupée personnellement du séquençage. La personne qui s'en chargeait rajoutait 8µl de Master Mix (ddNTP, ADN polymérase, tampon) pour porter le volume final à 20µl. Le séquençage s'est fait à l'aide de la machine Beckam Coulter CEQ2000XL DNA Analysis System.

Nom de l'amorce	Séquence (5' -> 3')	référence
I2 (ITS)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White & al. (1990)
I3 (ITS)	GCATCGATGAAGAACGCAGC	
I4 (ITS)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
EF 595F	CGTGACTTCATCAAGAACATG	Maphosa & al. (2006)
EF 1160R	CCGATCTTGTAGACGTCCTG	
LR0R (28 S)	ACCCGCTGAACTTAAGC	Vilgalys R. & Hester (1990)
LR3 (28 S)	CCGTGTTTCAAGACGGG	
LR5 (28 S)	TCCTGAGGGAAACTTCG	
LR6 (28 S)	CGCCAGTTCTGCTTACC	
fRPB2-5F (RPB2)	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	Matheny B. (2006)
bRPB2-6F (RPB2)	TGGGGYATGGTNTGYCCYGC	
bRPB2-7R (RPB2)	GAYGRTTRTGRTCRGGGAAVGG	
bRPB2-7.1R (RPB2)	CCCATRGCYTGYYTMCCCATDGC	

tableau a.5. Nature des amorces utilisées pour le séquençage

2°) Annexes relatives au chapitre « Résultats »

2.1°) Le concept biologique

Annexe 10

A.10.1. Détermination des facteurs d'incompatibilité

- Le Japon (n° MUCL 47982)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2			-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3				-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4					+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5						+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
6							-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7								-	-	-	+	+	-	-	-	-
8									-	+	+	-	-	-	-	-
9										-	-	-	-	-	-	-
10											-	-	-	-	-	-
11												-	-	+	+	+
12													-	+	+	+
13														-	-	-
14															-	-
15																-
16																

tableau a.6. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* du Japon

Nous observons (tableau a.6) que les monocaryons (1, 2, 7, 8, 14, 15 et 16) se croisent avec les monocaryons (11 et 12). Les monocaryons (3, 4, 6, 9, 10 et 13) croisent avec le monocaryon (5). Nous avons donc nos quatre groupes d'incompatibilité. Remarquons que les croisements (2 x 5) et (2 x 11) échappent à cette règle. Le monocaryon n° 2 n'a pas été retenu pour les expériences ultérieures. Les monocaryons (1, 7), (11, 12), (3, 4) et (5) ont été choisis en vue de réaliser les croisements intra et inter-continentaux.

- La Corée (n° MUCL 45904)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3				+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4					-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
5						-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
6							+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7								+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8									+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9										-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
10											-	+	+	-	-	-	-	-	-
11												+	+	-	-	-	-	-	-
12													-	+	-	+	+	-	-
13														+	-	+	+	-	-
14															-	-	-	-	-
15																-	-	+	+
16																	-	-	-
17																		-	-
18																			-
19																			

tableau a.7. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* de la Corée

Nous observons (tableau a.7) que les monocaryons (1, 12 et 13) se croisent avec les monocaryons (2, 5, 10, 11, 14, 16 et 17). Les monocaryons (3, 7, 9, 18 et 19) croisent avec les monocaryons (4, 6, 8 et 15). Nous avons donc nos quatre groupes d'incompatibilité. Les monocaryons (1, 13), (2, 5) (3, 7) et (4, 6) ont été retenus en vue de réaliser les autres croisements.

- Les Pays-Bas (n° MUCL 41564)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		-	-	+	+	+	-	-
2			-	+	+	+	-	-
3				+	+	+	-	-
4					-	-	-	-
5						-	-	-
6							-	-
7								-
8								

tableau a.8. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* des Pays-Bas

Nous observons (tableau a.8) que les monocaryons (1, 2 et 3) se croisent avec les monocaryons (4, 5 et 6). Les monocaryons (7 et 8) ne se croisent avec aucun monocaryon. On peut donc en déduire qu'ils font tous les deux parties du même groupe et que l'on ne dispose en que de trois groupes d'incompatibilité. Les monocaryons (1, 2), (4, 5) et (7, 8) sont retenus pour les tests ultérieurs.

- La France (n° MUCL 45888)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
2			-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
3				-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4					-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
5						-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6							-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
7								-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
8									-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
9										-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
10											-	-	-	-	+	+	+	-	+
11												-	+	-	-	-	-	+	-
12														-	+	+	+	-	+
13														+	-	-	-	-	-
14															-	-	-	+	-
15																-	-	-	-
16																	-	-	-
17																		-	-
18																			-
19																			

tableau a.9. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* de France

Nous observons (tableau a.9) que les monocaryons (1, 10 et 12) se croisent avec les monocaryons (3, 5, 15, 16, 17 et 19). Les monocaryons (2, 4, 6, 7, 8, 9, 13 et 18) croisent avec les monocaryons (11 et 14). Les 4 groupes d'incompatibilité ont pu être mis en évidence. Les monocaryons (1, 10), (3, 5) et (2, 4) et (11, 14) sont retenus pour les expériences suivantes.

- La Belgique (n° MUCL 47981)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		-	-	-	-	+	-	-
2			-	-	-	+	-	-
3				-	+	-	-	+
4					-	+	-	-
5						-	-	-
6							+	-
7								-
8								

tableau a.10. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* de Belgique

Nous observons (tableau a.10) que les monocaryons (1, 2, 4 et 7) se croisent avec le monocaryon (6). Le monocaryon (3) croise avec les monocaryons (5 et 8). Nous avons donc nos quatre groupes d'incompatibilité. Pour les expériences suivantes, les monocaryons (1, 2), (6) (3) et (5, 8) sont retenus.

- Le Canada (n° MUCL 40031)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1		-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
2			-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
3				-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
4					-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
5						-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6							+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
7								-	-	-	-	-	-	-	+	-
8									-	-	-	+	-	-	-	-
9										-	-	-	-	-	+	-
10												+	-	-	-	-
11													+	-	-	-
12														+	-	+
13															+	-
14																-
15																
16																

tableau a.11. Résultat des croisements des monospores issues de la souche mère de *P. fraxinea* du Canada

Nous observons (tableau a.11) que les monocaryons (1, 3 et 12) se croisent avec les monocaryons (5, 8, 10, 11, 14 et 16). Les monocaryons (2, 7, 9 et 13) croisent avec les monocaryons (4, 6 et 15). Nous avons donc nos quatre groupes d'incompatibilité. Les monocaryons (1, 3), (5, 8) (2, 7) et (4, 6) serviront donc pour les expériences ci-dessous.

A.10.2. Croisements intra-continentaux

Les différentes monospores (sélectionnées comme ci-dessus) issues d'une même souche mère sont croisées avec celles d'une autre souche de *P. fraxinea* issue d'un autre pays du même continent. Ces expériences correspondent aux tableaux a.12 à a.15 ci-dessous.

A.10.2.1. L'Asie :

- Croisement des monospores de la souche mère du Japon (n° MUCL 47982) avec celles de la souche mère de Corée (n° MUCL 45904)

Japon \ Corée	1	2	3	4	5	6	7	13
1	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+

tableau a.12. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Japon avec celles de la souche mère de Corée

La souche du Japon est parfaitement compatible avec la souche de Corée (tableau a.12). Elles font donc toutes les deux partie de la même espèce au sens biologique, il s'agit de deux populations différentes. Le fait que tous les croisements se révèlent positifs s'explique par le fait que les deux populations possèdent des allèles différents au niveau des facteurs d'incompatibilité.

- Croisement des monocaryons de la souche mère du Japon (n° MUCL 47982) avec ceux de la souche mère de la Chine (n° MUCL 47003)

Chine \ Japon	1	3	4	5	7	11	12
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+

tableau a.13 Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Japon avec ceux de la souche mère de Chine

La souche du Japon (n° MUCL 47982) est parfaitement compatible avec la souche de Chine (n° MUCL 47003) (tableau a.13). Elles font donc toutes les deux partie de la même espèce au sens biologique, il s'agit de deux populations différentes. Le fait que tous les croisements se révèlent positifs s'explique par le fait que les deux populations possèdent des allèles différents au niveau des facteurs d'incompatibilité : allèles 1 et 2 pour la Chine, allèles 3 et 4 pour la Corée et allèles 5 et 6 pour le Japon. Les populations de *P. fraxinea* du continent asiatique forment donc une seule espèce.

A.10.2.2. L'Europe :

- Croisement des monospores de la souche mère des Pays-Bas (n° MUCL 41564) avec celles de la souche mère de France (n° MUCL 45888)

Pays-Bas \ France	1	2	3	4	5	10	11	14
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

tableau a.14. Résultat des croisements des monospores de la souche mère des Pays-Bas avec celles de la souche mère de France

La souche des Pays-Bas est parfaitement compatible avec la souche de France (tableau a.14). Elles font donc toutes les deux partie de la même espèce au sens biologique, il s'agit de deux populations différentes. Le fait que tous les croisements se révèlent positifs s'explique par le fait que les deux populations possèdent des allèles différents au niveau des facteurs d'incompatibilité.

- Croisement des monospores de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981) avec celles de la souche mère des Pays-Bas (n° MUCL 41564)

Belgique \ Pays-Bas	1	2	4	5	7	8
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+

tableau a.15. Résultat des croisements des monospores de la souche mère de Belgique avec celles de la souche mère des Pays-Bas

La souche de Belgique est partiellement compatible avec la souche des Pays-Bas (tableau a.15). On pourrait imaginer que les quelques croisements négatifs sont dus à la présence d'un allèle commun entre les deux populations. Cependant, il n'est pas possible de répartir les allèles de manière à pouvoir expliquer ces croisements.

Certains autres croisements (surlignées dans le tableau a.15) devraient obligatoirement être négatifs pour soutenir cette théorie. [Gilbertson & Ryvarde, 1986]

Il semblerait plutôt que ces résultats négatifs sont la conséquence de la présence d'une trop grande quantité d'hyphes squelettiques. En effet, après un petit moment, les hyphes génératifs, ceux qui présentent des boucles, sont remplacés par des hyphes à parois épaisses vidés de leur contenu cytoplasmique. Ces hyphes n'ont plus de septa et donc plus de boucles non plus. Sans doute ces croisements auraient-ils été positifs si j'avais observé les résultats quelques jours plus tôt. Quoi

qu'il en soit, on doit sans doute pouvoir affirmer sans risque de faire erreur que ces deux populations font partie de la même espèce au sens biologique.

A.10.3. Croisements inter-continentaux

Les différentes monospores issues d'une même souche sont croisées avec celles d'une autre souche de *P. fraxinea* issue d'un autre continent. Ces expériences correspondent aux tableaux a.16 à 22 présentés ci-dessous.

- Croisement des monospores de la souche mère de Corée (n° MUCL 45904) avec celles de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981)

Belgique \ Corée	1	2	3	4	5	6	7	13
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

tableau a.16. Résultat des croisements des monospores de la souche mère de Corée avec celles de la souche mère de Belgique

La souche de Corée est totalement incompatible avec la souche de Belgique (tableau a.16). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme.

- Croisement des monospores de la souche mère du Japon (n° MUCL 47982) avec celles de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981)

Belgique \ Japon	1	3	4	5	7	11	12
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-

tableau a.17. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Japon avec celles de la souche mère de Belgique

La souche du Japon est totalement incompatible avec la souche de Belgique (tableau a.17). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme. Les populations asiatiques de *P. fraxinea* sont isolées sur le plan reproducteur de celles de l'Europe.

- Croisement des monospores de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec celles de la souche mère de France (n° MUCL 45888)

Canada \ France	1	2	3	4	5	10	11	14
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-

tableau a.18. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Canada avec celles de la souche mère de France

La souche du Canada est totalement incompatible avec la souche de France (tableau a.18). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme.

- Croisement du dicaryon (souche mère des USA, n° MUCL 47692) avec les monocaryons de la souche mère de Belgique (n° MUCL 47981)

Ces croisements n'ont été réalisés que sur un nombre très réduit de souches.

Belgique	1	2	3	5	6	8
USA	-	-	-	-	-	-

tableau a.19. Résultat des croisements du dicaryon des USA avec les monospores de la souche mère de Belgique

La souche du Canada est totalement incompatible avec la souche de Belgique (tableau a.19). Nous sommes donc en présence de deux espèces différentes au sens biologique du terme. Les populations américaines de *P. fraxinea* sont isolées sur le plan reproducteur de celles de l'Europe.

- Croisement des monospores de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec celles de la souche mère de Corée (n° MUCL 45904)

Corée \ Canada	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	-	+	+
2	+	-	+	+	-	+	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	+
5	-	-	+	+	-	+	+	+
6	+	-	+	+	-	+	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+
13	-	+	+	+	+	+	+	+

tableau a.20. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Canada avec celles de la souche mère de Corée

La souche du Canada est partiellement compatible avec la souche de Corée (tableau a.20). quarante-huit résultats parmi soixante-quatre sont positifs. Les deux souches sont compatibles à 75%. Cela ne peut pas être dû à la possession d'un allèle commun parce que les résultats ne se disposent pas de manière à soutenir cette théorie.

- Croisement du dicaryon (souche mère des USA, n° MUCL 47692) avec les monospores de la souche mère de la Chine (n° MUCL 47003)

Ces croisements n'ont été effectués que sur un nombre très réduit de souches.

Chine	1	2	3	4	5	6	8	10
USA	+	+	+	+	-	-	+	-

tableau a.21. Résultat des croisements du dicaryon des USA avec les monospores de la souche mère de Chine

La souche des USA est partiellement compatible avec la souche de Chine (tableau a.21). Cinq résultats parmi huit sont positifs. Les deux souches sont compatibles à 63%.

- Croisement des monospores de la souche mère du Canada (n° MUCL 40031) avec celles de la souche mère du Japon (n° MUCL 47982)

Japon \ Canada	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	-	-	+	-
7	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	-	-	-	+	-
12	+	+	+	-	-	-	+	-

tableau a.22. Résultat des croisements des monospores de la souche mère du Canada avec celles de la souche mère du Japon

La souche du Canada est partiellement compatible avec la souche du Japon (tableau a.22). Quarante-quatre résultats parmi cinquante-six sont positifs. Les deux souches sont compatibles à 79%. Cela ne peut pas être dû à la possession d'un allèle commun parce que les résultats ne se disposent pas de manière à soutenir cette théorie. Ces résultats sont plutôt liés au fait qu'il existe encore une certaine compatibilité entre les souches asiatiques et américaines.

2.2°) Le concept phylogénétique

Annexe 11

- Phylogénie basée sur les ITS (figure a.1)

L'analyse a tout d'abord été menée sur un nombre beaucoup plus important de souches de *P. fraxinea* mais, au sein de chaque continent, seules certaines souches ont été retenues après une première analyse qui avait révélé qu'il n'y avait pratiquement pas de variation entre ces souches. Cela permet également de diminuer le temps de calcul.

De manière générale, les souches conservées sont celles pour lesquelles les séquences pour chacun des trois autres marqueurs avaient pu être obtenues et, bien entendu, les souches utilisées pour les croisements (concept biologique).

La souche de *P. latissima* (41397) a été définie comme outgroup.

Analysons l'un de ces arbres (figure a.1). Les souches de *P. fraxinea* forment un clade monophylétique qui est assez faiblement supporté (46%). A l'intérieur de ce clade, des clades plus petits se sont formés. Ceux-ci correspondent parfaitement avec l'origine géographique des souches. Le sous-clade asiatique possède un ancêtre commun avec le sous-clade américano-européen, qui lui-même se scinde en deux parties (Amérique d'une part, Europe d'autre part). Le sous-clade asiatique n'est pas très fortement supporté (42%) mais le sous-clade américano-européen est très bien supporté (98%) de même que la subdivision suivante (92% pour l'Amérique et 99% pour l'Europe).

La relation qu'entretient *P. unguolata* et *P. latissima* (outgroup) avec les autres souches est très fortement supportée (100%). Cette phylogénie met également en évidence deux espèces nouvelles asiatiques (46931 et 46928 en Chine et 49133 au Japon) et une autre en Afrique (47466 au Gabon). On peut remarquer également que le clade des *P. robiniophila* est très bien supporté (99%) et se classe loin par rapport aux *P. fraxinea*.

En fait, les ITS permettent l'obtention de clades terminaux très bien supportés mais ne donnent pas d'informations solides en ce qui concerne les relations des taxons les uns avec les autres.

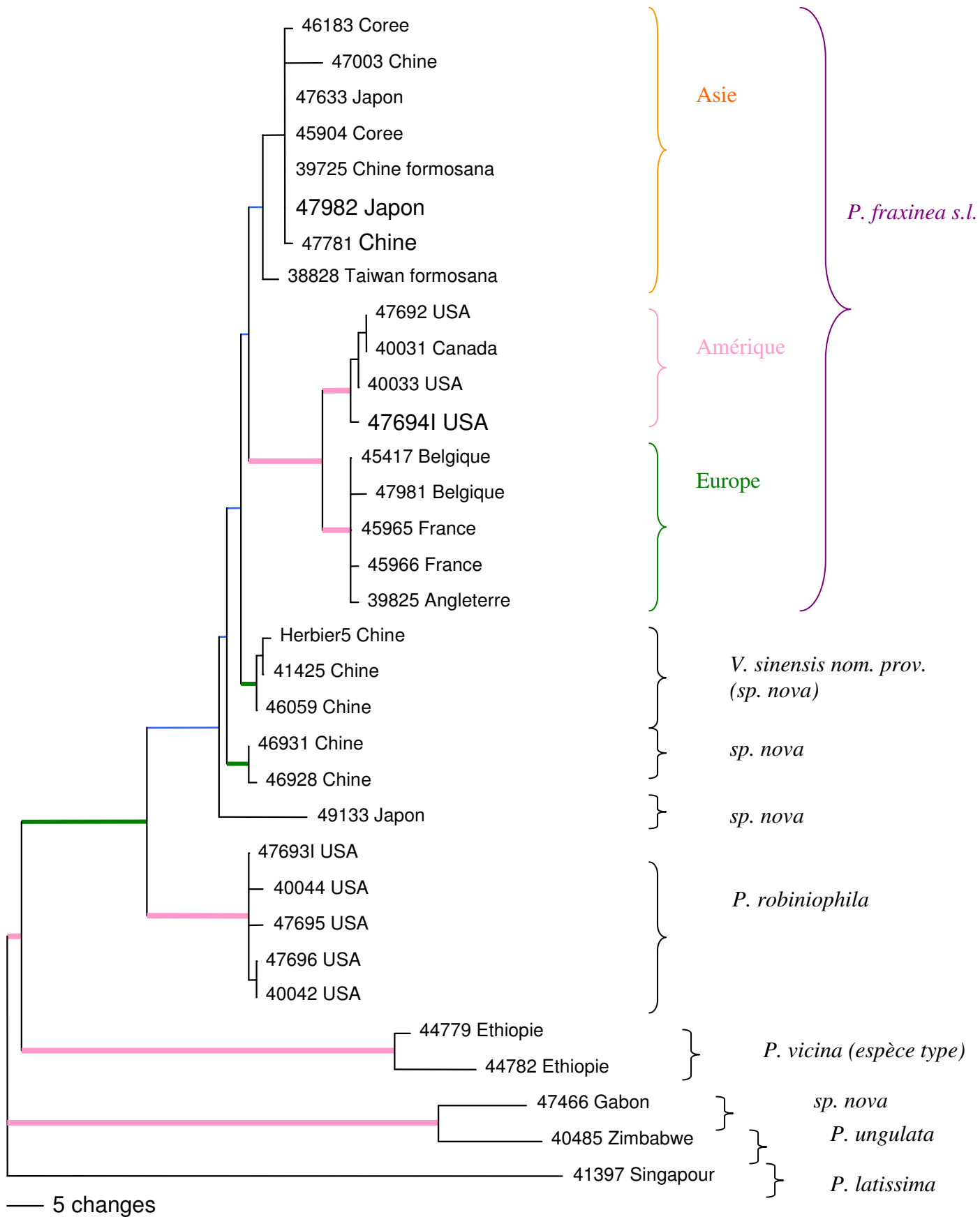


figure a.1. Phylogénie basée sur les ITS

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

- Phylogénie basée sur les EF (figures a.2 à a.3)
Les souches présentées dans l'arbre retenu ont été sélectionnées de la même manière que celles de l'arbre des ITS. La souche de *P. latissima* (47459) a été définie comme outgroup.

Parmi les différents arbres, il y a deux types de topologies (figures a.3 et a.4). Chacune présente *P. fraxinea* comme un clade monophylétique (59% de support) avec, à nouveau, trois sous-clades qui correspondent à l'origine géographique des souches. L'une d'elle fait partir les trois sous-clades du même ancêtre commun, tandis que l'autre montre que le sous-clade américain possède un ancêtre commun avec le sous-clade eurasiatique. Les trois sous-clades sont à nouveau très bien supportés (98% pour l'Amérique, 73% pour l'Europe et 97% pour l'Asie, figure a.5). Comme pour les ITS, les clades terminaux ont un fort support mais les relations entre les taxons ne sont pas très solides. L'outgroup est parfaitement supporté (99%), de même que la relation qu'entretient *P. unguolata* avec les autres souches. Cette phylogénie met également en évidence la nouvelle espèce du Japon (49131 à 49133). Encore une fois, le clade des *P. robiniophila* est très bien supporté (100%) et se classe loin par rapport aux *P. fraxinea*.

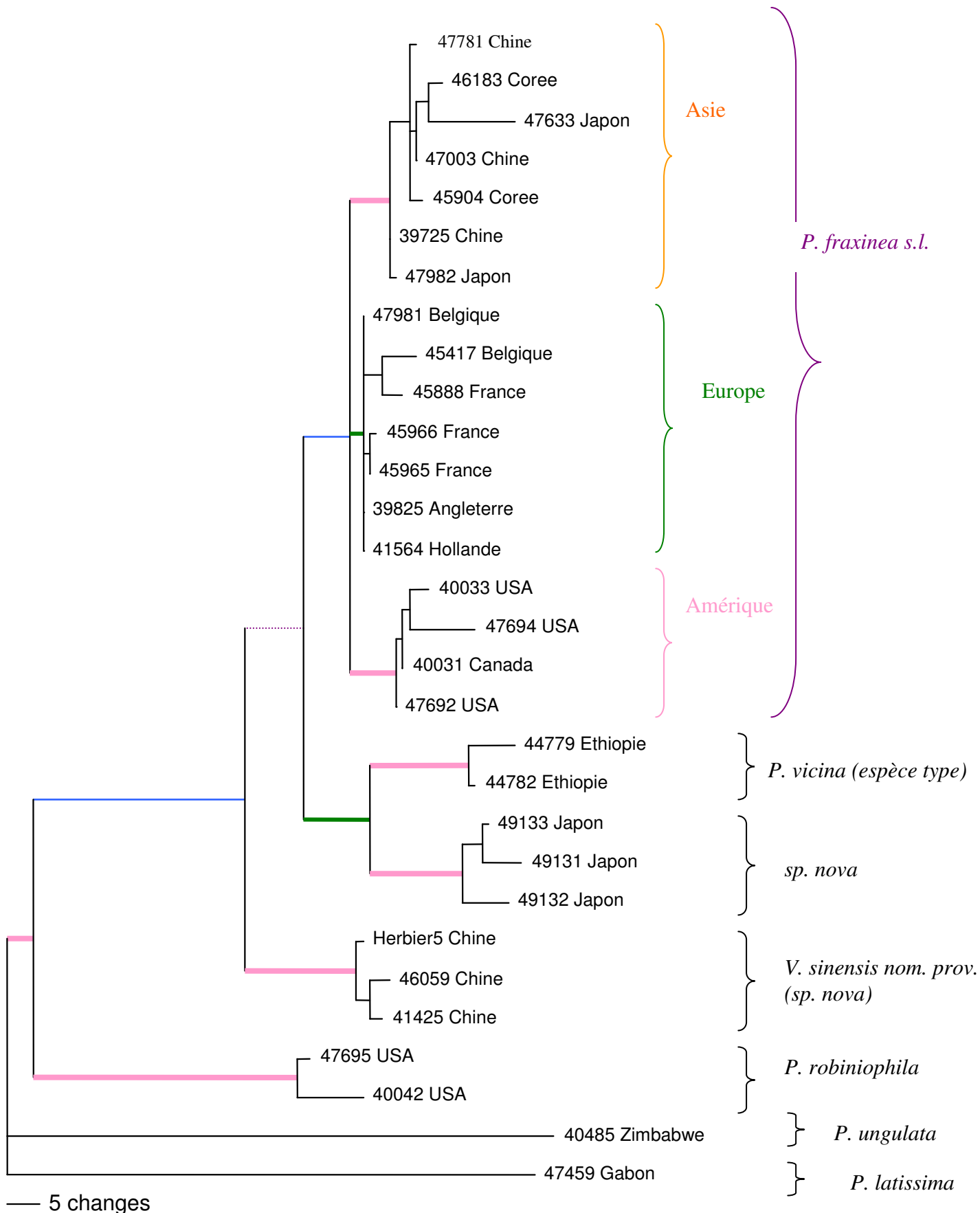


figure a.2. Phylogénie basée sur les EF (1^{ère} topologie)

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

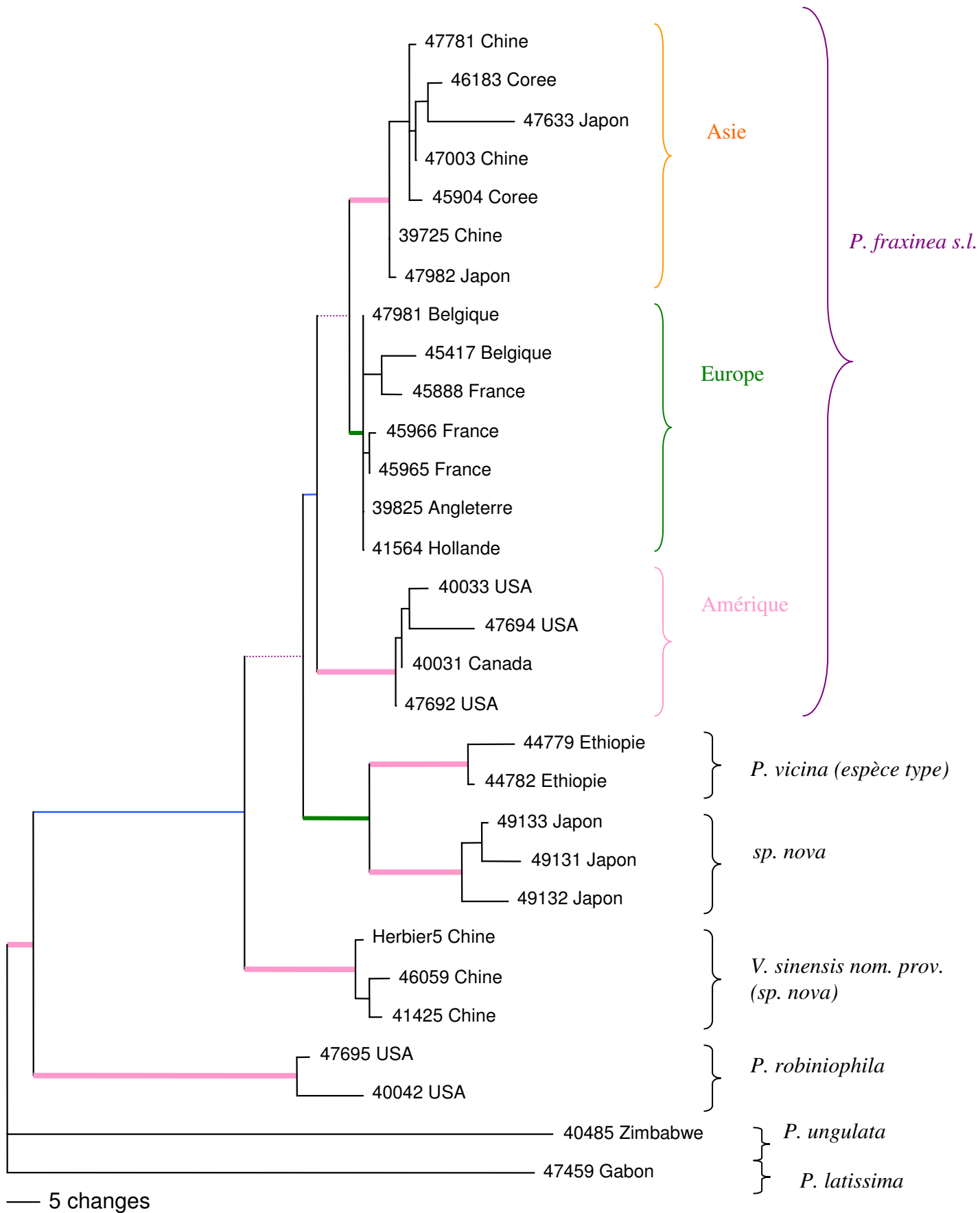


figure a.3. Phylogénie basée sur les EF (2^{ème} topologie)

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

- Phylogénie basée sur les 28S (figures a.4)

Les souches présentées dans l'arbre retenu ont été sélectionnées de la même manière que celles de l'arbre des ITS et des EF. La souche de *P. latissima* (41397) a été définie comme outgroup.

Parmi les différents arbres, aucun ne présentait *P. fraxinea* comme un clade monophylétique (figure a.4). Les topologies étaient très variables d'un arbre à l'autre parce qu'aucune branche ne possédait de support. Ce marqueur n'est pas discriminant, il ne donne pas de résolution. Par contre, les clades terminaux sont à nouveau relativement homogènes : les souches de *P. fraxinea* originaires d'Europe se classent toutes ensemble, de même que les souches d'Amérique et que les *P. robiniophila*.

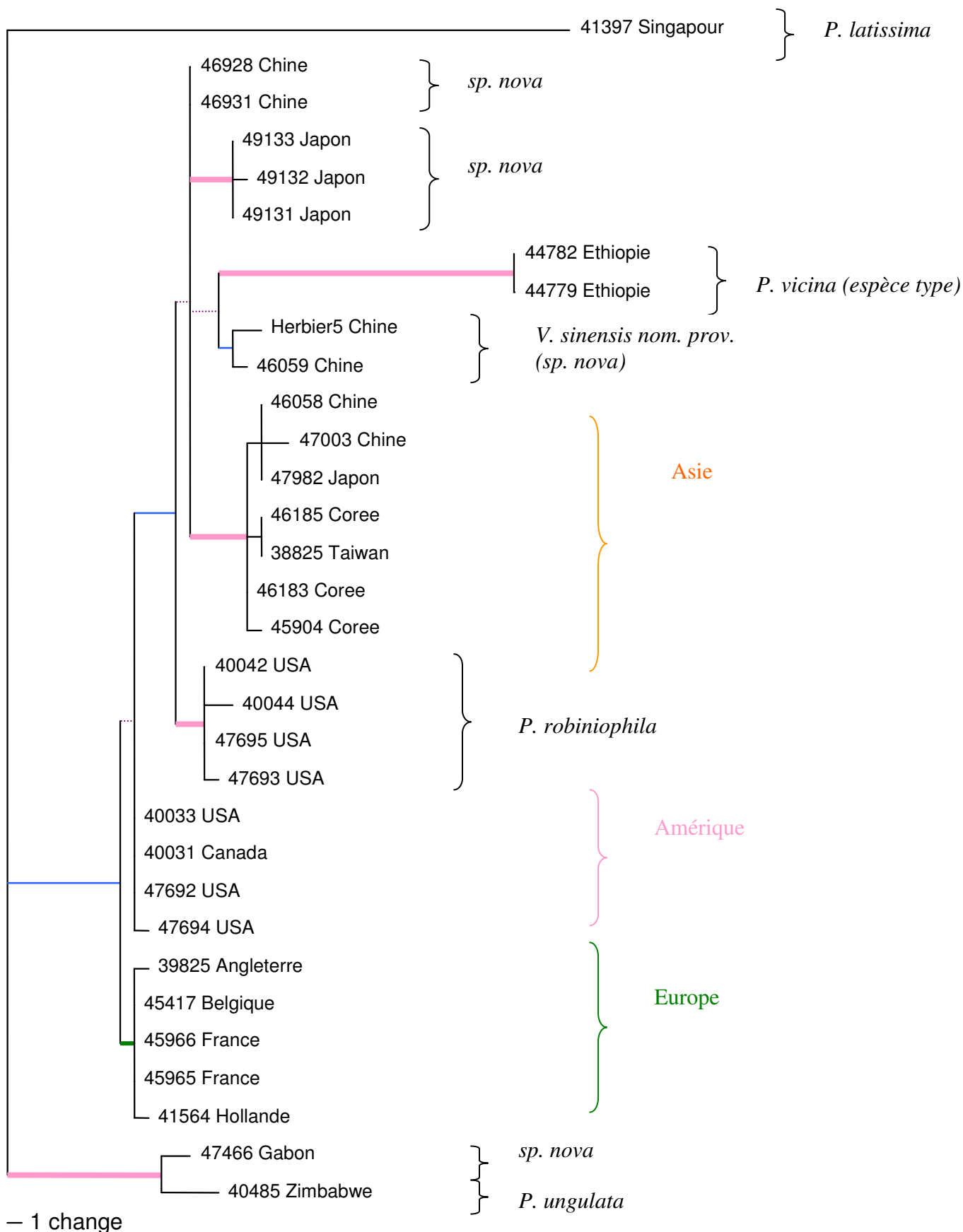


figure a.4. Phylogénie basée sur les 28S

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%

- Phylogénie basée sur les RPB2 (figure a.5)
Cet arbre phylogénétique contient un nombre très réduit de souches parce que j'ai eu énormément de difficultés à amplifier (et d'avantage encore à séquencer) ce gène (figure a.8). Les amorces contiennent beaucoup de positions variables et la température d'hybridation est fort basse. La souche de *P. unguolata* (40485) a été définie comme outgroup parce que nous avons observé qu'elle était fort éloignée des autres souches dans les phylogénies ITS et EF. (Je n'ai pas réussi à obtenir la souche de *P. latissima* avec ce marqueur) Quoiqu'il en soit, comme nous l'avons observé dans le cas des ITS et des EF, *P. fraxinea* forme un clade monophylétique à l'intérieur duquel les sous-clades se distribuent comme dans la phylogénie des ITS.

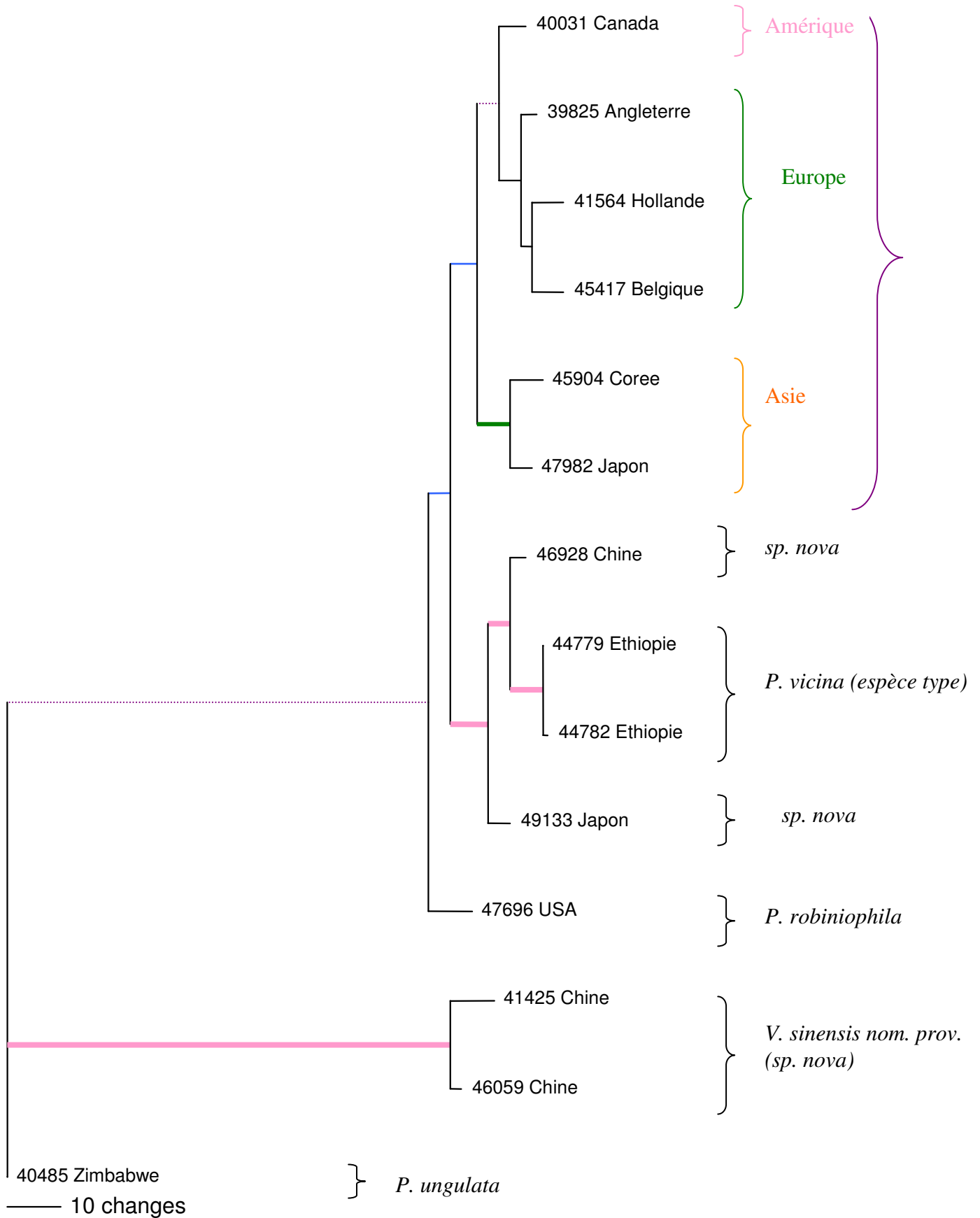


figure a.5. Phylogénie basée sur les RPB2

lignes roses épaisses : support > 80% ; lignes vertes moyennes : 80% > support > 60% ; lignes bleues fines : 60% > support > 40% ; lignes violettes pointillées : support < 40%