

Pr 6103 B

ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 19 Fascicule 1-2 1998



1998

PUBLICATION TRIMESTRIELLE

Jun 1998

Centre MNI IN Paris

CRYPTOGAMIE

Mycologie

ANCIENNE REVUE DE MYCOLOGIE
fondée par R. Heim en 1936

Directeur de la publication : Hélène Bischler-Causse
Rédaction : Bruno DENNETIÈRE & Jean MOUCHACCA
ÉDITEUR : A.D.A.C. — 12 RUE BUFFON F-75005 PARIS

COMITÉ DE LECTURE

A. BELLEMÈRE (Paris), J. BOIDIN (Lyon), D. CHABASSE (Angers), R. COURTECUISSÉ (Lille), G. DURRIEU (Toulouse), J. FAYRET (Toulouse), W. GAMS (Baarn), G. L. HENNEBERT (Louvain-la-Neuve), P. JOLY (Paris), C. MONTANT (Toulouse), C. MOREAU (Brest), D. N. PEGLER (Kew), M.-F. ROQUEBERT (Paris), B. SUTTON (Kew), G. TURIAN (Genève), D. ZICKLER (Orsay).

MANUSCRITS

Les manuscrits doivent être adressés directement à la rédaction. La rédaction peut demander l'avis d'un lecteur même s'il n'appartient pas au Comité de Lecture. Bien qu'étant une revue de langue française, les articles rédigés en anglais, allemand, italien et espagnol sont acceptés. Les disquettes de micro-ordinateurs (PC ou Mac) sont vivement souhaitées. Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le fascicule I de chaque tome. Les auteurs recevront 25 tirés-à-part gratuits ; les exemplaires supplémentaires seront à leur charge.

TARIFS DES ABONNEMENTS tome 19, 1998

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : Algologie, Brlologie-Lichénologie, Mycologie

Pour une section :	France : (380 F ht)	387,98 F ttc	Étranger : 410,00 F
Pour les 3 sections :	France : (1030 F ht)	1051,63 F ttc	Étranger : 1130,00 F

Paiement par chèque bancaire ou postal à l'ordre de

A.D.A.C. — CRYPTOLOGIE (CCP La Source 34 764 05 S)

adressé à : A.D.A.C. 12 rue Buffon, F-75005 Paris

CRYPTOGAMIE, Mycologie est indexé par *Biological Abstracts*, *Current Contents*, *Geo Abstracts*, *GEOBASE*, Publications bibliographiques du CNRS (Pascal).

Copyright — 1998. CRYPTOLOGIE-ADAC

Illustration de la couverture : *Laboulbeniales*, dessin inédit de J. Balazuc

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 19 FASCICULE 1-2 1998

CONTENTS

J. PERREAU — Patrick JOLY (6 novembre 1932-22 octobre 1997)	1
S. RAPIOR, S. BREHERET, T. TALOU, Y. PELISSIER, M. MILHAU & J.-M. BESSIERE — Volatile components of fresh <i>Agrocybe aegerita</i> and <i>Tricholoma sulfureum</i>	15
F. GAITIS — Response of <i>Aspergillus carbonarius</i> to Tween 80. Mycelial growth, protein, RNA and chitin content.....	25
G. PLATAS, F. PELÁEZ, J. COLLADO, G. VILLUENDAS & M. T. DíEZ — Screening of antimicrobial activities by aquatic hyphomycetes cultivated on various nutrient sources	33
P. KAISER — Relations of <i>Leucopaxillus giganteus</i> , basidiomycete of fairy rings, with soil microflora and grassland plants	45
Y. KOULALI, A. ES-SGAOURI & R. DARGENT — Effects of monensin on ultrastructure and chemical composition parietal fractions of <i>Botrytis cinerea</i>	63
B. RANKOVIC — Populations of fungi in some reservoirs in Serbia	79
A. VERBEKEN & J. VESTERHOLT — A new <i>Lactarius</i> species from Scandinavia in the section <i>Dapetes</i>	87
L. RYVARDEN — The genus <i>Aleurocystis</i>	93
F. D. CALONGE & D. N. PEGLER — <i>Zelleromyces hispanicus</i> sp. nov. (Russulales, Elasmomycetaceae), an orange-red species possibly related to <i>Lactarius aurantiacus</i>	99
B. MORENO-ARROYO, J. GOMEZ & F. D. CALONGE — <i>Zelleromyces gienensis</i> sp. nov. (Russulales), a gasteroid fungus from the southern of Spain.....	107
Y. WANG, G. MORENO, L. J. RIOUSSET, J. L. MANJÓN, G. RIOUSSET, G. FOURRÉ, G. DI MASSIMO, L. G. GARCÍA-MONTERO & J. DíEZ — <i>Tuber pseudoexcavatum</i> sp. nov. a new species from China commercialised in Spain, France and Italy with additional comments on Chinese truffles	113

Bibliothèque Centrale Muséum



3 3001 00046124 3



Source : MNHN, Paris

F. ESTEVE-RAVENTÓS, Á. BANARES, E. BELTRÁN & J. L. RODRÍGUEZ — Mycological study of the biosphere reserve « El Canal y los Tiles » (La Palma, Canary Islands). IV. <i>Agaromycetidae</i> (part. 3). Genus <i>Inocybe</i>	121
C. OCHOA, G. MORENO, A. ALTÉS & H. KREISEL — <i>Calvatia pygmaea</i> (Gasteromycetes) in the deserts of Baja California Sur (Mexico)	131
H. NEZZAR-HOCINE, R. J. BOUTEVILLE, J. GUIMBERTEAU, R. PERRIN & G. CHEVALIER — Macrofungal flora associated with <i>Cedrus</i> <i>atlantica</i> (Endl.) Manetti ex Carrière II — Ectomycorrhizal fungi in a cedar plantation (Djurjura mountains, Algeria)	139
New taxa and new combinations proposed in <i>Cryptogamie-Mycologie</i> 19(1-2)...	163
Instructions to authors	165

Patrick JOLY
(6 novembre 1932-22 octobre 1997)



Emporté par une implacable maladie, Patrick JOLY s'est éteint le 22 octobre 1997 à Paris, non loin du Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle où, pendant près de quarante années, il a travaillé comme chercheur en phytopathologie et mycologie. Directeur de Recherche au C.N.R.S., ayant exercé différentes fonctions administratives et d'enseignement, ayant également participé à l'activité de plusieurs Sociétés scientifiques, il avait dans des horizons très divers, bien au delà du cadre de la Biologie végétale, de nombreux collègues et amis qui appréciaient son acuité d'esprit, sa vaste culture tout comme son inaltérable affabilité. Tous ont ressenti sa disparition avec une peine sincère.

Patrick JOLY est né le 6 novembre 1932 à Villemomble (Seine-Saint-Denis), localité de l'est parisien moins urbanisé qu'aujourd'hui, dans une famille d'imprimeurs liée aux milieux des arts, notamment la musique. Ses études au Lycée Montaigne lui apportent, en plus des connaissances qu'il doit déjà à son entourage, une solide formation tant littéraire que scientifique. Il a toutefois une prédilection pour les Sciences Naturelles, en particulier la Botanique à laquelle un oncle l'a initié. C'est ainsi que, après avoir obtenu en 1950 la deuxième partie du baccalauréat, section Sciences Expérimentales, et sur le conseil de l'un de ses professeurs, il prépare — et réussit en juin 1951 —, le concours d'entrée à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon. Trois ans plus tard exactement, il quittera cet établissement avec le diplôme d'Ingénieur Agricole. Dès ce moment, il se fixe un objectif : travailler sur la génétique des végétaux.

A Grignon cependant, il commence à découvrir le monde des champignons en suivant les cours de J. MONTÉGUT et les excursions sur le terrain que celui-ci dirige. Pour effectuer le stage de fin d'études demandé par M. GUILLEMAT, phytopathologiste à l'Ecole, le jeune homme est présenté par son ancien professeur de classe supérieure au Lycée Louis-le-Grand, M. CAZALAS qui avait été élève du botaniste et mycologue Fernand MOREAU, au fils de ce dernier, phytopathologiste au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum. Claude MOREAU et Mireille MOREAU, son épouse, accueillent l'étudiant et lui proposent d'examiner le comportement en culture d'un Hyphomycète parasite de plantes, l'*Alternaria dauci* f. sp. *solani*. Patrick JOLY démontre que, sur milieu artificiel, ce champignon perd rapidement ses capacités à sporuler et que l'inhibition de germination *in vitro* de ses spores ne peut donc pas — contrairement à ce qu'avançait l'américain Mac CALLAN — être utilisée comme test d'évaluation de l'efficacité du pouvoir fongicide de substances chimiques.

Dans le temps même où, en juin 1954, il achève un Mémoire sur ce sujet, Patrick JOLY entre au Laboratoire de Cryptogamie dirigé par Roger HEIM, pour y préparer une thèse de Doctorat au titre de Boursier du Muséum. Il passe les trois certificats d'Etudes Supérieures (Physiologie Générale, Botanique, Géologie) nécessaires pour obtenir la Licence ès Sciences Naturelles, avant de partir au service militaire qui dure alors plus de deux ans. Envoyé dix-sept mois en Algérie, plus précisément en Kabylie, il s'attache, malgré les hostilités, à récolter de nombreux échantillons de champignons parasites de végétaux. A son retour au Laboratoire, début 1959, il obtient grâce à l'appui de R. HEIM un poste au C.N.R.S et peut se consacrer à des recherches sur les *Alternaria* et genres voisins, alliant avec méthode, prélèvements sur le terrain, essais culturaux, patientes observations au microscope et minutieuses vérifications dans les ouvrages de la bibliothèque qu'il connaissait mieux que personne.

Souhaitant préciser chez ces champignons une systématique jusque-là presque uniquement basée sur l'aspect morphologique des spores pluriloculaires, Patrick JOLY introduit dans son travail l'analyse de critères physiologiques et biologiques : il considère par exemple le taux de sporulation, la vitesse de croissance du mycélium ou les liens étroits existant entre le métabolisme, de l'azote par exemple, et le pouvoir pathogène. Utilisant la méthode hématimétrique avec une rigueur accrue pour évaluer les quantités de spores produites par chaque culture, il réalise également de véritables dissections de spores vivantes afin d'examiner les modalités des inhibitions de la germination entre loges d'une même spore. Il mène à bien ces délicates expérimentations grâce, en particulier, aux techniques de micromanipulation apprises, à l'Institut Pasteur de Paris, auprès de P. DE FONBRUNE qui les a perfectionnées. Accompagnés de dessins finement réalisés, les résultats des observations font l'objet de toute une série de publications dont une Thèse de Doctorat d'Etat intitulée « Le genre *Alternaria* ». Celle-ci, reprise pour l'essentiel dans un ouvrage édité par Paul LECHEVALIER, est brillamment soutenue le 24 janvier 1964 à la Faculté des Sciences d'Orsay, devant un jury composé des Professeurs G. MANGENOT, M. CHADEFAUD, J. CHEVAUGEON et R. HEIM. Ce travail succède à celui de P. NEERGAARD paru en 1945 et devient aussitôt une référence sur le sujet. Mais le jeune chercheur, toujours sensible à ce qui touche au domaine des livres et aux techniques d'édition, sera surtout fier — il aimait à le rappeler — de voir son premier article imprimé dans les pages du Bulletin de la Société Mycologique de France, en 1959.

D'autres Micromycètes attirent l'attention de Patrick JOLY et le conduisent à effectuer différents travaux de Mycologie appliquée. Il publie ainsi des relevés floristiques de certaines régions de France, d'Europe centrale et de zones tropicales, également des

révisions critiques chez des champignons parasites des palmiers, d'arbres fruitiers ou de diverses plantes cultivées, décrivant par exemple avec P. COUR le *Cercospora selaginellarum*, agent d'une maladie des sélaginelles dans les serres du Muséum et du Phytotron à Gif-sur-Yvette. Il aborde aussi quelques problèmes plus importants, tels ceux concernant les pourritures des bananes entre la récolte et la consommation, ou encore les pourritures noires des agrumes. Dans cette optique, il analyse les modalités de succession des semi-saprophytes ou des parasites impliqués dans les « flores primitives », originaires des plantations, et les « flores normales de dégradation », intervenant lors du transport, pour déterminer l'efficacité des moyens de prévention et de lutte.

Avec cette première partie de son activité scientifique consacrée à l'examen de divers « *Fungi imperfecti* », Patrick JOLY se trouve d'emblée confronté au problème de la classification naturelle des champignons. Vers le milieu de notre siècle s'est justement dessinée une modification profonde des orientations de recherches en Mycologie. Jusqu'alors essentiellement descriptives et morphologiques, les études laissent une place de plus en plus large aux données biologiques et à leur interprétation statistique. Dès le début de sa carrière, Patrick JOLY sait donc que la systématique présente un double rôle : d'un côté, c'est un moyen d'étude qui permet — théoriquement du moins — l'identification des spécimens ; d'un autre côté, sa mission est de séparer et classer les organismes, selon leurs affinités réelles, en faisant appel à toutes les données que peut procurer l'ensemble des disciplines biologiques. En effet, les caractères morphologiques, éminemment variables en fonction du mode de vie de chaque individu, non seulement ne peuvent plus suffire pour la délimitation et la classification naturelle des espèces mais constituent trop souvent, du fait de convergences, une source d'erreur et de confusion. Tendre vers une meilleure compréhension des mécanismes intimes de la vie des champignons et de leur fonctionnement par l'utilisation de méthodes expérimentales plus dynamiques, représente le plan directeur des recherches de Patrick JOLY.

Ses idées se sont centrées sur deux thèmes principaux, notion d'espèce et interactions hôtes-parasites, que ce soit en phytopathologie ou, plus largement, en mycologie, car il disait lui-même n'avoir eu aucun mal à passer de l'une à l'autre. Suivant, dans une époque où le champ des connaissances n'était pas si cloisonné que maintenant, l'exemple de ses Maîtres, il s'intéresse en effet très tôt, aux Macromycètes. Dès 1959, il rédige de petits articles destinés au grand public et profite de son séjour au Viêt-Nam pour récolter Xylaires, Bolets, Amanites, Russules ou Lentins dans les pinèdes du Lang-Bian afin d'apporter des renseignements supplémentaires sur la répartition géographique des espèces fongiques. Quels que soient les champignons, Micro- ou Macromycètes, dont ils traitent, ses travaux ont pour finalité de contribuer à l'amélioration des connaissances en systématique. Ils lui vaudront des distinctions honorifiques tels que le Prix du Conseil de la Société Botanique de France en 1968 et le Prix MONTAGNE décerné par l'Académie des Sciences en 1978 tandis que l'année suivante lui sera remise la Médaille de vermeil de l'Académie d'Agriculture.

Dans la deuxième phase de ses travaux, Patrick JOLY apporte une contribution à l'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. Avec différentes collaborations dont celle de son épouse Françoise, physicienne, il considère des groupes très polymorphes : champignons isolés des sols désertiques, espèces fongiques de la flore séminicole des haricots cultivés, Ustilaginales et même Hépatiques du genre *Calypogeia*. Le but à atteindre, après avoir affecté à chacun des caractères disponibles un indice proportionnel à la quantité d'information qu'il renferme, est de réaliser une synthèse de toutes les données connues sur les organismes pris en



Patrick JOLY (au centre), en octobre 1959 dans la forêt de Fontainebleau, lors des cueillettes destinées au Salon du Champignon organisé par le Laboratoire de Cryptogamie.

compte et, par des calculs appropriés, de mettre en évidence la distinction d'ensembles naturels et l'appréciation de leurs affinités, voire de leur hiérarchisation. A la lumière de ces indications qui portent sur des comportements écophysiologiques (réaction à l'éclaircissement ou à la température, halophilie, osmophilie, etc...), Patrick JOLY tire une conclusion en analysant la signification de ces « caractères » en systématique supra-spécifique et évalue les limites de leur utilisation pour la classification. Paru en 1977, l'article qui expose ces résultats, est particulièrement révélateur d'une pensée douée d'un pouvoir aigu d'abstraction et de généralisation, comme l'exige justement la construction de la systématique.

A partir de 1980, il aborde la troisième partie de ses recherches avec l'étude des populations chez des Basidiomycètes, les Pleurotes. En collaboration avec Roger CAILLEUX, mais aussi avec le concours de botanistes, il considère les Pleurotes des Ombellifères. Très voisines les unes des autres mais inféodées, dans la nature, à des espèces différentes comme le Panicaut (*Eryngium campestre*), la Fêrulle ou les *Laserpitium*, ces formes gardent leurs caractéristiques en culture artificielle. Tant sur la base des morphologies basidiocarpiques, des particularités culturales, du polymorphisme enzymatique et des caryotypes que sur celle des spécificités pathogènes, Patrick JOLY et Roger CAILLEUX reconnaissent chez ces champignons quatre entités dont l'ensemble est

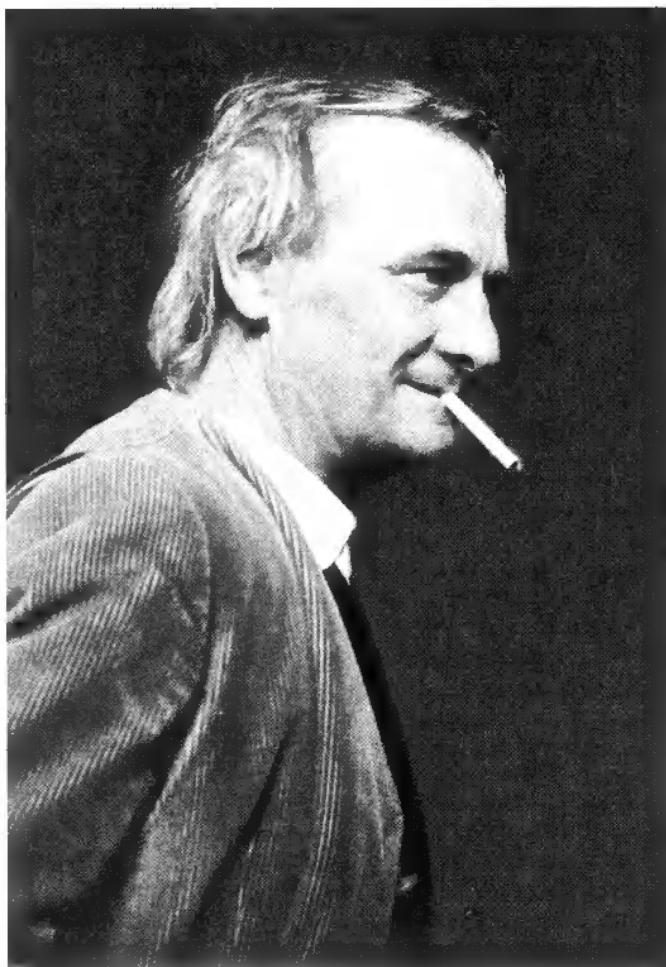
interprétable en terme d'éco — ou coeno-espèce. Ils montrent aussi que l'effet pathogène des Pleurotes des Ombellifères relève du modèle des pourridiés perthotrophiques, car dans la nature, ces champignons sont des parasites agressifs, tuant leur hôte et fructifiant ensuite sur les racines mortes. Leurs observations les conduisent cependant à mieux définir les relations de co-adaptation, aux confins de la symbiose, entre populations du champignon et populations de plantes-hôtes qui profitent dans une certaine mesure de la présence du parasite. En effet, les Pleurotes attaquent moins facilement les *Eryngium* adultes mais y provoquent une stérilité du pollen : l'augmentation du taux de fécondation croisée chez les plantes encore résistantes est ainsi favorisée et induit une amélioration de la quantité de graines qui germent et donnent des plantes vigoureuses. Ce processus contribue donc au renouvellement des Panicauts et à la pérennité de la station.

Par la suite et toujours avec Roger CAILLEUX, Patrick JOLY s'intéresse à la délimitation des espèces chez des Pleurotes saprophytes du groupe *Pleurotus pulmonarius* / *ostreatus* dont les basidiocarpes sont d'habitus et de morphologie presque semblables, poussant quelquefois sur les mêmes essences. Il étudie les conditions d'apparition dans la nature et les caractéristiques des souches en culture, comme la croissance mycélienne et la thermotolérance. Ces observations sont complétées par l'analyse de la structure génétique chez des populations de ces champignons. L'existence de deux espèces distinctes est ainsi confirmée ; de plus, des indications originales sont apportées sur les phénomènes de rupture de phase entre l'équilibre endémique et le déséquilibre épidémique qui surviennent au niveau des populations locales de ces Pleurotes lignicoles.

Tous ces travaux ont été réalisés dans le cadre d'une carrière de chercheur au Centre National de la Recherche Scientifique. Attaché de Recherche en 1960, chargé en 1964, Patrick JOLY devient maître de Recherche en janvier 1969 et sera directeur de Recherche au début de 1984. A partir de 1972, il se voit d'abord confier la direction de l'Equipe de Recherche n° 120 du C.N.R.S. implantée au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum, puis de 1976 à 1983, celle de l'équipe « Spore, sporogenèse, sporulation » du Laboratoire associé au C.N.R.S. n° 257. En même temps, il dirige trois Thèses de 3^e cycle et, en 1984, la Thèse d'Etat de M.-C. BOISSELIER qui traite de la variabilité génétique chez les Pleurotes des Ombellifères.

Mais parallèlement, il assume de multiples responsabilités de gestion de la recherche. Secrétaire de la Section 20 (Biologie et Physiologie Végétales) du Comité National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.) de 1971 à 1975, il est élu président de la Section 27 de ce même Comité pour la période 1976-1980, tout en étant également vice-président du Comité National des Sciences Biologiques. Il est par ailleurs membre de divers Conseils comme le Conseil Supérieur des Universités (Sciences Biologiques), président du Comité Consultatif du Cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur dès 1979 ; il fait aussi partie du Jury d'Agrégation de Pharmacie (1983) et, depuis 1985, du Jury des concours de recrutement en Sciences Pharmaceutiques des Personnels de l'Enseignement Supérieur.

Nombreux sont ceux qui ont bénéficié de son enseignement à l'occasion de cours. Ainsi, lors de ses missions botaniques au Viêt-Nam (1962 et 1967), Patrick JOLY est chargé d'un cours de Mycologie et de Pathologie Végétale à l'Ecole Supérieure Agronomique, Forestière et Vétérinaire de Saigon ainsi que d'un enseignement de 3^e cycle à la Faculté des Sciences de cette même ville. A Paris, à la demande de F. MARIAT et G. SEGRÉTAÏN, puis de C. de BIÈVRE, il participe de 1976 à 1997 au Cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur. Pendant plusieurs années, il expose le problème des champignons vénéneux ; sans retenir l'aspect anthropomorphique de la consommation de certaines espèces, il s'attache surtout à la signification botanique de l'existence de subs-



tances qui, élaborées par le métabolisme fongique, ont une action toxique vis-à-vis de l'organisme animal. Ensuite, il présente dans ses leçons les caractères généraux des champignons et insiste sur la diversité et l'originalité des cycles de reproduction. Ce thème sera repris pour une série de conférences données au Muséum, lors d'un enseignement sur la systématique.

En outre, son activité s'est étendue au développement de structures fédératives faisant intervenir des Laboratoires de différentes Universités, du Muséum, de l'Institut Pasteur ou de l'I.N.R.A. Ces projets ont concerné tant la mise en place d'une Banque de souches fongiques dans le cadre de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes que l'élaboration d'un programme d'ensemble sur la Systématique végétale. Toutefois, certaines circonstances survenues dans une période de remaniement des dispositions administratives de la Recherche ne lui ont pas permis de réaliser ce qu'il avait souhaité

Hommage à André MAUBLANC
(1896-1958)

M. André Joly, chargé de France de la Bibliothèque des volumes 71 à 90 de la Bibliothèque de la rue de 1906 à 1912, puis de 1920 à 1952, n'aurait dû se démettre de ses fonctions qu'après avoir assumé les responsabilités annuelles de ses collègues, et le directeur du Bulletin André MAUBLANC n'aurait dû, et n'a pu, le faire, que si André MAUBLANC n'avait constitué la première de ces commissions, et si elle n'avait pu, à son tour, le faire. Ses efforts ne sont pas demeurés vains et la Société Mycologique de France est, comme il a tant aimé le dire, une Société qui a voulu faire un hommage à son fondateur. Le Bulletin de la Société Mycologique de France est, comme il a tant aimé le dire, une Société qui a voulu faire un hommage à son fondateur. Le Bulletin de la Société Mycologique de France est, comme il a tant aimé le dire, une Société qui a voulu faire un hommage à son fondateur. Le Bulletin de la Société Mycologique de France est, comme il a tant aimé le dire, une Société qui a voulu faire un hommage à son fondateur.

Patrick JOLY, chargé de France de la Bibliothèque des volumes 71 à 90 de la Bibliothèque de la rue de 1906 à 1912, puis de 1920 à 1952, n'aurait dû se démettre de ses fonctions qu'après avoir assumé les responsabilités annuelles de ses collègues, et le directeur du Bulletin André MAUBLANC n'aurait dû, et n'a pu, le faire, que si André MAUBLANC n'avait constitué la première de ces commissions, et si elle n'avait pu, à son tour, le faire. Ses efforts ne sont pas demeurés vains et la Société Mycologique de France est, comme il a tant aimé le dire, une Société qui a voulu faire un hommage à son fondateur.

Premières lignes du manuscrit de l'« Hommage à André Maublanc », rédigé par Patrick JOLY en 1981.

pour le Laboratoire de Cryptogamie ; il en fut légitimement affecté et par la suite, privilégia ses recherches.

Chercheur infatigable, organisé et méthodique, Patrick JOLY reste malgré ses multiples obligations, d'une disponibilité d'esprit à toute épreuve. Qui d'entre nous au Laboratoire n'a pas frappé inopinément, au 4^e étage, à la porte de son petit bureau éclairé par une lucarne grande ouverte sur le ciel, pour demander un renseignement ? Abandonnant aussitôt les feuilles qu'il vient de couvrir d'une écriture serrée, il pose sa cigarette et, avec un sourire, assure qu'il reprendra aisément le fil de ses pensées. Attentif aux problèmes qui lui sont posés, il suggère une idée, donne un conseil, trouve une solution. Lors des collaborations, où d'ailleurs il prend en général plus que sa part de travail, on reconnaît les signes de sa curiosité intellectuelle, de son immense mémoire, de sa vive imagination tempérée par une prudence réfléchie. Souvent, au cours de la rédaction, pour préciser un terme ou affiner une idée, sont abordées des questions d'étymologie ou d'évolution des concepts en systématique. Car, si les controverses nomenclaturales, qu'il qualifie volontiers de débats procéduriers, ne lui importent guère, l'histoire des sciences par contre le passionne.

Dans ce domaine, Patrick JOLY publie quelques études. Avec J. SEMAL et D. LAMY, il analyse des documents permettant de mieux définir les étapes de l'identification du *Phytophthora infestans*, responsable de l'épidémie qui ravagea les cultures de pommes de terre en Europe, en 1845. Il a l'occasion de s'intéresser à un herbier

mycologique étiqueté selon la nomenclature d'Adanson, aux champignons en cire venant de Vienne et surtout, aux magnifiques velins de la collection « ancienne » de champignons — ce qui l'amène à réaliser un tableau comparatif des concepts génériques chez les champignons, de Tournefort à Micheli. Mais il a également un regard personnel sur les développements de la Biologie végétale et de la « Cryptogamie » depuis la fin du XIX^{ème} siècle : aussi bien dans les milieux agronomiques qu'au Muséum, à l'Institut Pasteur ou à la Société Mycologique de France, il rencontre tous les professeurs qui ont été les acteurs de cette évolution. Il leur voue une profonde estime et les écoute attentivement parler de leur vie, de leur expérience, de leurs travaux. Quel plaisir alors d'entendre Patrick JOLY rapporter ces souvenirs et raconter des anecdotes qui faisaient revenir au siècle dernier : on se retrouvait au temps du chimiste Michel-Eugène CHEVREUL, mort plus que centenaire en 1889 et qu'avait connu le biologiste Gabriel BERTRAND — né en 1867 et disparu en 1962 — ou à celui des naturalistes-voyageurs ! Plus pratiquement, la collection de portraits de cryptogamistes, au Laboratoire, doit sa mise en place à cet attachement que Patrick JOLY témoignait aux traditions et aux documents anciens. Par contre lui-même, à moins d'être dans un groupe, n'aimait guère être photographié et surtout pas dans l'attitude qu'il jugeait trop conventionnelle, du scientifique devant son microscope.

Avec la personnalité et l'érudition qui sont les siennes, Patrick JOLY ne peut manquer de souhaiter partager son savoir et faire découvrir le monde des champignons. Il assure cette mission de diffusion des connaissances à tous les niveaux et de toutes les façons. Ce sont des informations données sur le terrain, à l'occasion de nombreuses conférences ou lors d'expositions mycologiques, en particulier au moment du Salon du Champignon, au Muséum, auquel il apporta un concours actif pendant plus de vingt-cinq ans. Ce sont aussi des articles destinés au grand public, des clés pratiques de détermination ou des synthèses plus ardues, publiées dans l'*Encyclopaedia Universalis* ; des chapitres d'ouvrages réservés aux spécialistes ou des livres, intitulés « Les Champignons » ou « Guide des Champignons », plusieurs fois réédités et qui représentent de véritables petits traités de Mycologie.

Une large part du temps de Patrick JOLY est également consacrée aux activités d'associations scientifiques où il trouve une atmosphère à la fois savante et amicale qui lui plaît. S'il est ainsi membre d'un certain nombre d'entre elles — Société Botanique de France dès le 9 décembre 1955, Naturalistes Parisiens parmi lesquels il est introduit par A. MAUBLANC, Société Française de Phytopathologie que fonde G. VIENNOT-BOURGIN en 1971, Société Française de Systématique — c'est à la Société Mycologique de France où il est présenté par C. et M. MOREAU, qu'il ira son attachement le plus profond. Il lui marquera en vérité un dévouement absolu, depuis son admission, à l'Assemblée générale du 2 mars 1959, jusqu'à la limite de ses forces, en fin d'été 1997. Elu au Conseil d'Administration en 1963 à la place de P. GUINIER, il entre au Bureau l'année suivante en tant qu'archiviste-bibliothécaire adjoint. Devenu à partir de 1966 secrétaire chargé du *Bulletin*, il veut bien, à la suite du décès de P. OSTOYA pour qui il avait la plus grande admiration, exercer durant quelques mois, en 1969-1970, les fonctions de secrétaire général intérimaire, avant que H. ROMAGNESI n'en prenne la responsabilité ; puis il assure la présidence de 1985 à 1988, dans une période difficile pour la Société qui doit trouver un local pour son siège social et enfin, le titre de Membre d'Honneur lui est conféré par le Conseil d'Administration, le 20 janvier 1996. Aucune tâche, si considérable ou fastidieuse soit-elle, ne le décourage : rédaction des rapports sur les sessions annuelles, correction d'épreuves, et surtout, mise en pages du *Bulletin*. En tant que directeur de la publication depuis 1971, il tient à faire profiter la S.M.F. de

tout son savoir concernant les règles typographiques ou la composition en imprimerie. Connaissant admirablement la Société, sa gestion, ses statuts mais aussi son histoire, il aura à cœur pour célébrer le Centenaire, en 1984, de réunir articles et documents photographiques sur les nombreux mycologues qui, de près ou de loin, ont participé à la vie de cette association où lui-même a tant œuvré avec une persévérante attention et un parfait désintéressement.

Sens du devoir, fermeté de convictions mais grande tolérance pour les idées des autres, vivacité de l'intelligence, tels étaient quelques uns des traits marquants de la personnalité de Patrick JOLY. Réserve et tellement sociable, perspicace et indulgent, réfléchi et si enjoué, une lueur amusée passerait dans son regard, saisissant tout le paradoxe à vouloir donner les multiples facettes de son caractère. Tous ceux qui l'ont bien connu, se souviendront de sa modestie réelle et de la qualité de son amitié.

J. PERREAU

LISTE DES PUBLICATIONS DE PATRICK JOLY

- 1954 — *Alternaria dauci* (Kühn) Groves & Skolko f. sp. *solani* (Ell. & Mart.) Neergaard et son utilisation comme test de fongicides. *Rapport bibliographique. Ecole Nat. d'Agriculture, Grignon*, 5 juin 1954, 43 p. dactylogr.
- 1959 — Variations morphologiques et notion d'espèce chez le genre *Alternaria* (Nees) Wiltshire. *Bull. Soc. Mycol. France*, **75**, 2 : 149-158.
- 1959 — Russules et Lactaires. *Rustica*, n° **38** : 1364.
- 1959 — Les Cèpes. *Rustica*, n° **41** : 1472-1473.
- 1959 — Les champignons : les plus redoutables ennemis des arbres. *Science et Nature*, n° **35** : 4-7.
- 1959 — Une importante manifestation mycologique et phytopathologique : le Salon du Champignon. *Fruits d'Outre-Mer*, **14**, 10 : 431-432.
- 1960 — Attention aux champignons des arbres. *Rustica*, n° **9** : 332-333.
- 1960 — Les Levures. *Rustica*, n° **24** : 928.
- 1960 — Champignons d'été. *Rustica*, n° **31** : 1176.
- 1960 — Sur les causes d'erreurs dans l'emploi de la méthode hématimétrique pour évaluer le taux de sporulation chez les champignons. *Bull. Soc. Mycol. France*, **76**, 3 : 275-290.
- 1960 — Les champignons des prés. *Rustica*, n° **41** : 1586.
- 1960 — Champignons d'hiver. *Rustica*, n° **49** : 1928.
- 1961 — Micromycètes récoltés en Tchécoslovaquie au cours de la II^e Session Européenne de Mycologie. *Bull. Soc. Mycol. France*, **77**, 1 : 68-76.
- 1961 — Un champignon étrange : La Truffe. *Rustica*, n° **15** : 517.
- 1961 — Le genre *Sphaerodothis* Shear. *Bull. Res. Council, Israël. Sect. D : Bot.*, **10** : 187-193.
- 1961 — Les poisons des champignons. *Rustica*, n° **19** : 650.
- 1961 — Les Chanterelles. *Rustica*, n° **24** : 819.
- 1961 — *Champignons : formes et couleurs* (version française de l'ouvrage de Kleijn). Paris. Horizons de France, 1961, 143 p.
- 1961 — Espèces nouvelles ou intéressantes de la flore des bananes. *Revue de Mycologie*, **26**, 2 : 89-99.
- 1961 — Les flores de dégradation des bananes. *Revue de Mycologie*, **26**, 2 : 101-117.
- 1961 — Champignons aux formes étranges : Les Pézizes. *Rustica*, n° **29** : 1019.
- 1961 — Les champignons des forêts de feuillus. *Rustica*, n° **37** : 1306.
- 1961 — L'automne, saison des champignons. *Rustica*, n° **38** : 1321.

- 1961 — Recherches sur le *Thielaviopsis paradoxa-musarum* Mitch. *Bull. Soc. Mycol. France*, **77**, 3 : 219-228.
- 1961 — Les champignons des bois de Résineux. *Rustica*, n° **43** : 1510.
- 1961 — Les Polypores. *Rustica*, n° **47** : 1654-1655.
- 1961 — Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. I. — Rapports entre la nutrition azotée, le pH et la vie anaérobie. *Revue de Mycologie*, **26**, 4 : 243-257.
- 1962 — Champignons : formes et couleurs. 2^e éd. Paris. Horizons de France éd., 143 p.
- 1962 — Les pourritures des bananes au cours du transport et en mûrisserie. *Fruits d'Outre-Mer*, **17**, 1 : 23-31.
- 1962 — Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. II. — Nutrition carbonée. *Bull. Soc. Mycol. France*, **78**, 1 : 80-91.
- 1962 — Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. III. — Action de la lumière et des ultra-violets. *Revue de Mycologie*, **27**, 1 : 1-16.
- 1962 — Rapport sur le Congrès de Montluçon (1961). *Bull. Soc. Mycol. France*, **78**, 2 : XXXIII-LIII.
- 1962 — Recherches sur les genres *Alternaria* et *Stemphylium*. IV. — Action des blessures mécaniques. *Revue de Mycologie*, **27**, 3 : 165-167.
- 1962 — Rapport sur le Congrès de Font-Romeu — Perpignan (1962). *Bull. Soc. Mycol. France*, **78**, 4 : LXXXIII-XCIX.
- 1962 — Les pourritures des bananes. *Cameroun Agric., Past. et Forest.*, n° **55** : 26-30.
- 1964 — Le genre *Alternaria*. Recherches physiologiques, biologiques et systématiques. (Thèse de Doctorat ès Sciences, Université de Paris, Faculté des Sciences d'Orsay, 24 janvier 1964).
- 1964 — Données récentes sur la génétique des champignons supérieurs (Ascomycètes et Basidiomycètes). *Revue de Mycologie*, **29**, 1-2 : 115-186.
- 1964 — Recherches sur la nature et le mode de formation des spores chez le genre *Torula*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **80**, 2 : 186-196.
- 1964 — Le genre *Alternaria*. Recherches physiologiques, biologiques et systématiques. *Encyclopédie Mycologique*. Paris, Lechevalier, **XXXIII**, 250 p.
- 1964 — Sur quelques Bolétales de la Flore du Viêt-Nam. *Bull. Soc. Mycol. France*, **80**, 4 : 385-395 (J. PERREAU et P. JOLY).
- 1964 — Clé de détermination des espèces les plus communes du genre *Alternaria* (Nees) Wiltsh. emend. Joly. *Revue de Mycologie*, **29** (paru 1965), 5 : 348-351.
- 1965 — Sur quelques Champignons foliicoles du *Kentia forsteriana*. *Revue de Mycologie*, **30**, 1-2 : 42-51.
- 1965 — Deux champignons nouveaux des îles Comores. *Revue de Mycologie*, **30**, 3 : 133-140.
- 1965 — Recherches sur la germination des spores du *Trichothecium roseum* Link ex Fr. *C. R. Acad. Sci., Paris*, **260** : 2887-2890.
- 1965 — Eléments de la flore mycologique du Viêt-Nam (Seconde contribution). *Bull. Soc. Mycol. France*, **81**, 2 : 269-287, pl. IV.
- 1965 — A propos de *Pillularia pullulans* (de Bary) Berkhout. *Bull. Soc. Mycol. France*, **81**, 3 : 402-420.
- 1965 — Un parasite nouveau des Sélaginelles : *Cercospora selaginellarum*. *Revue de Mycologie*, **30** (paru 1966), 4 : 225-230 (P. COUR et P. JOLY)
- 1965 — Champignons observés sur inflorescences de *Panicum maximum* Jacq. *Cahiers de la Muhoké*, **3**, 2 : 137-138.
- 1965 — Les cortèges de champignons parasites dans les maladies des plantes. *Science-Progrès, La Nature*, n° **3366** : 380-385.
- 1965 — Liste des espèces récoltées au cours du Congrès, in Le Congrès de la S.M.F. à Saint-Dié (4-11 septembre 1965). *Bull. Soc. Mycol. France*, **81**, 4 : LVII-LXXXII.
- 1965 — Un grand explorateur botaniste : Eugène Poilane (1888-1964). *Revue de Mycologie*, **30** (paru 1966), 5 : 303-306, pl. III.
- 1966 — L'écologie des champignons : mœurs étranges ou habitat rationnel? *Science et Nature*, n° **77** : 2-11.

- 1966 -- *Champignons : formes et couleurs*. 3^e éd. Paris, Horizons de France, 143 p.
- 1966 -- Recherches sur les inhibitions de la germination observées dans les semis multispores du *Trichothecium roseum*. *Revue de Mycologie*, **31**, 3 : 233-243.
- 1966 -- Recherches sur la germination des spores du *Trichothecium roseum* Link ex Fr. - III. Influence de l'âge des spores. *Bull. Soc. Mycol. France*, **82**, 4 : 582-599.
- 1966 -- Liste des espèces récoltées au cours du Congrès, in Le Congrès de la S.M.F. à Paris (4-11 septembre 1966). *Bull. Soc. Mycol. France*, **82**, 4 : XXXV-XLIV.
- 1966 -- Les modes d'intervention des champignons dans les maladies cryptogamiques. *Agriculture*, n° **293** : 317-319.
- 1967 -- Les pourritures des Agrumes provoquées par les *Alternaria*. *Fruits d'Outre-Mer*, **21**, 2 : 89-95.
- 1967 -- Key for determination of the most common species of the genus *Alternaria*. *Plant Disease Repertorium*, **51**, 4 : 296-298.
- 1967 -- A propos du développement fongicole du *Nectria purtonii* (Grev.) Berk. *Bull. Soc. Mycol. France*, **83**, 1 : 198-210.
- 1967 -- Les polypores et le schizophrène. In : G. VIENNOT-BOURGIN. *Les champignons parasites des arbres fruitiers à noyau*, Paris, Ponsot : 119-127.
- 1967 -- Clés des principales Amanites de la flore française. *Revue de Mycologie*, **32**, 2 : 162-175.
- 1968 -- Eléments de la flore mycologique du Viêt-Nam. III. Troisième contribution : A propos de quelques Xylarias. *Revue de Mycologie*, **33**, 2-3 : 155-207.
- 1968 -- Eléments de la flore mycologique du Viêt-Nam. IV. La flore des pinèdes du plateau du Lang-Bian. *Bull. Soc. Mycol. France*, **84**, 4 : 529-565.
- 1969 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. I. -- Etude du groupe des *Alternaria sensu lato*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **85**, 2 : 213-233.
- 1969 -- Ascomycètes. *Encyclopaedia universalis*, **2** : 545-549.
- 1969 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. II. Etude des espèces européennes, africaines et sud-américaines de *Calypogeia*. *Rev. Bryol. et Lichen.*, **36** (1968-1969), 3-4 : 691-714 (H. BISCHLER et P. JOLY).
- 1969 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. III. Etude de l'action des variations du pH sur le développement de quelques champignons des sols désertiques. *Bull. Soc. Mycol. France*, **85**, 4 : 503-526 (J. MOUCHACCA et P. JOLY).
- 1970 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. IV. Sur l'éventualité de l'intervention d'un espace libre de Donnan cellulaire dans l'absorption des cations par les champignons. *Bull. Soc. Mycol. France*, **86**, 3 : 765-792 (P. JOLY, F. JOLY et J. MOUCHACCA).
- 1970 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. V. Etude de l'action des fortes concentrations de NaCl sur le développement de quelques champignons des sols désertiques. *Bull. Soc. Mycol. France*, **86**, 4 : 883-910 (J. MOUCHACCA, P. JOLY et F. JOLY).
- 1971 -- A propos d'*Alternaria macrospora* Zim., parasite des feuilles de cotonnier (*G. hirsutum* L.). *Coton et Fibres tropicales*, **26**, 2 : 259-262 (P. JOLY et R. LAGIÈRE).
- 1971 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. VI. Etude cinétique de la croissance mycélienne chez les champignons. *Bull. Soc. Mycol. France*, **87**, 4 : 657-674 (P. JOLY, F. JOLY et BUI-THU-CUC).
- 1971 -- Mycoses des végétaux. *Encyclopaedia universalis*, **11** : 499-504.
- 1972 -- Application de traitements numériques à la systématique des Ustilaginales. I. Le genre *Melanotaenium*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **88**, 2 : 193-208 (C. ZAMBETTAKIS et P. JOLY).
- 1972 -- Essais d'application de méthodes de traitement numérique des informations systématiques. VII. -- Etude de la flore séminicole des haricots cultivés. *Bull. Soc. Mycol. France*, **88**, 3-4 : 315-325 (P. JOLY et L. KANSOU).
- 1972 -- *Les Champignons*. Paris, Hatier, « Collection Couleurs de la Nature » 256 p.

- 1973 — Application de traitements numériques à la systématique des Ustilaginales. II. Le genre *Tolyposporium*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **89**, 1 : 83-97 (C. ZAMBETTAKIS et P. JOLY).
- 1973 — *Pilze*. Stuttgart, Belser Verlag, 255 p.
- 1973 — Le monde des champignons. *Science et Nature*, n° 119 : 9-14.
- 1974 — Etude de la mycoflore des sols arides de l'Égypte. I. Le genre *Penicillium*. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* (devenue *European Journal of Soil Biology*), **11** : 67-88 (J. MOU-CHACCA et P. JOLY).
- 1974 — *Paddestoelen in kleuren*. Wageningen, Zomer & Kenning Boeken, 255 p.
- 1975 — Application de traitements numériques à la systématique des Ustilaginales. III. Le genre *Thecaphora*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **91**, 1 : 71-88 (C. ZAMBETTAKIS et P. JOLY).
- 1976 — *Mycologie et Pathologie forestières* (L. LANIER, P. JOLY, P. BONDOUX et A. BELLE-MÈRE). Tome II — *Pathologie forestière*. Paris, Masson, 478 p.
- 1976 — Etude de la mycoflore des sols arides de l'Égypte. II. Le genre *Aspergillus*. *Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* (devenue *European Journal of Soil Biology*), **13** : 293-313 (J. MOU-CHACCA et P. JOLY).
- 1976 — Les champignons vénéneux. *Revue de Mycologie*, **40**, 2 : 185-201.
- 1977 — A propos du Cortinaire couleur de rocou (*Cortinarius orellanus* Fr.). *Bull. Soc. Mycol. France*, **93**, 2 : (135)-(136) (P. JOLY et J. PERREAU).
- 1977 — Sur quelques champignons sauvages consommés au Viêt-Nam. In : *Travaux dédiés à G. Viennot-Bourgin*. Paris, Société Française de Phytopathologie : 159-168 (P. JOLY et J. PERREAU).
- 1977 — La signification des « caractères » en systématique supra-spécifique : Exemple des caractères écophysiologicals en mycologie. *Revue de Mycologie*, **41**, 3 : 339-348.
- 1978 — Aspect botanique du problème des toxines fongiques : exemple des toxines neurologiques et neuro-végétatives. In : *Champignons toxiques*. Paris, Masson, Collection de Médecine Légale et Toxicologique, n° 106 : 129-134.
- 1978 — *Mycologie et Pathologie forestières* (L. LANIER, P. JOLY, P. BONDOUX et A. BELLE-MÈRE). Tome I — *Mycologie forestière*. Paris, Masson, 487 p.
- 1979 — Composition en acides gras des lipides totaux des spores de quelques Discomycètes. *Bull. Soc. Mycol. France*, **95**, 2 : 83-88 (L.M. MELÉNDEZ-HOWELL, J.-C. KADER et P. JOLY).
- 1980 — Marcelle LE GAL (1895-1979). *Cryptogamie. Mycol.*, **1**, 2 : 93-96.
- 1980 — Variabilité de la fructification du *Pleurotus eryngii* en culture. *Cryptogamie. Mycol.*, **1**, 2 : 119-138 (R. CAILLEUX, A. DIOP, A.-M. SLÉZEC et P. JOLY).
- 1980 — Roger HEIM (1900-1979). *Bull. Soc. Bot. France*, **127**, *Lettres bot.*, 2 : 201-204.
- 1981 — Relations d'interfertilité entre quelques représentants des Pleurotes des Ombellifères. *Bull. Soc. Mycol. France*, **97**, 2 : 97-124 (R. CAILLEUX, A. DIOP et P. JOLY).
- 1981 — Hommage à André MAUBLANC (1880-1958). Introduction aux Tables des volumes 71 à 90. *Bull. Soc. Mycol. France*, **97**, 4 : III-VIII (non signé).
- 1982 — Etude de l'Herbier de Camille Montagne relatif au *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (= *Botrytis infestans* Mont.). *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, **17** (paru 1983), 3 : 295-305 (J. SEMAL, P. JOLY et D. LAMY).
- 1983 — L'épidémie de « maladie des pommes de terre » causée en Europe en 1845 par le *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary : les faits et les auteurs. *Annales de Gembloux*, **89** : 79-99 (J. SEMAL, P. JOLY et D. LAMY).
- 1983 — Etude d'une station de *Pleurotus eryngii* DC ex Fr. : peuplement de Panicauts et peuplement de Pleurotes. *Bull. Soc. Mycol. France*, **99**, 2 : 157-202 (R. CAILLEUX, M.-T. CERCEAU-LARRIVAL, J.-L. HAMEL et P. JOLY).
- 1984 — Ascomycètes. *Encyclopaedia universalis*, 2^e édit., **2** : 837-841.
- 1984 — Basidiomycètes. *Encyclopaedia universalis*, 2^e édit., **3** : 324-330.
- 1984 — Champignons. *Encyclopaedia universalis*, 2^e édit., **4** : 592-599, 2 pl. coul.
- 1984 — *Les Champignons*. Paris, Hatier, « Collection Guide Point Vert », 119 p.

- 1984 — Les vélins de la collection « ancienne » de champignons et la « méthode nouvelle » de classification des plantes. *Bull. Soc. Mycol. France*, **100**, 3 : 1-10, Atlas, pl. 235 et 236.
- 1985 — Etude de quelques stations de *Pleurotus eryngii* du sud-est de la France : représentativité du modèle de Montrichard. *Bull. Soc. Mycol. France*, **101**, 1 : 61-91 (R. CAILLEUX, M.-T. CERCEAU-LARRIVAL et P. JOLY).
- 1985 — Communication sur un ensemble de champignons desséchés, étiquetés d'après la nomenclature de Michel Adanson. Extrait du compte rendu des séances. *Bull. Soc. Mycol. France*, **101**, 3 : (51)-(52).
- 1985 — René DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, mycologue. In : *Hommage à René DUJARRIC DE LA RIVIÈRE*. Preyssac d'Excideuil, Impr. de l'Eperon : 41-44.
- 1985 — Mycoses des végétaux. *Encyclopaedia universalis*, 2^e édit., **12** : 849-851.
- 1986 — Les classifications botaniques. In : L'ordre et la diversité du vivant : Quel statut scientifique pour les classifications biologiques ? Paris, Fayard, « Fondation Diderot. Nouvelle Encyclopédie des Sciences et des Techniques » : 52-67.
- 1986 — Conservation et instabilité des souches de champignons filamenteux ; impact de la cryoconservation. *Bull. Soc. bot. France*, **133**, *Actualités bot.*, 3 : 105-124 (J. DUPONT, P. JOLY, M.-F. ROQUEBERT et C. DE BIÈVRE).
- 1986 — Festival d'Automne. *L'Univers du Vivant*, n° **14** : 78-79.
- 1986 — Georges VIENNOT-BOURGIN (17 avril 1906 — 8 février 1986). *Cryptogamie, Mycol.*, **7**, 2 : 95-102.
- 1986 — *Guide des Champignons*. Paris, Hatier, « Collection Guide de la nature », 254 p.
- 1987 — Etude de quelques stations italiennes de *Pleurotus eryngii* : progression mycélienne et structure des populations. *Cryptogamie, Mycol.*, **8**, 1 : 101-124 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1987 — Hommage au chanoine Hubert BOURDOT [Congrès de la Société Mycologique de France à Montluçon (Allier) (11-19 octobre 1986)]. *Bull. Soc. Mycol. France*, **103**, 3 : (46)-(49).
- 1987 — Etude de quelques stations italiennes du Pleurote de la Férule. *Bull. Soc. Mycol. France*, **103**, 4 : 315-346 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1988 — Les Pleurotes des Ombellifères : modèle de « pourridié naturel » et d'« espèce mycologique » chez les Basidiomycètes « symbiotiques » — I. Effet pathogène. *Bull. Soc. Mycol. France*, **104**, 2 : 79-108 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1989 — Les Pleurotes des Ombellifères : modèle de « pourridié naturel » et d'« espèce mycologique » chez les Basidiomycètes « symbiotiques » — II. Co-adaptation et équilibre endémique. *Bull. Soc. Mycol. France*, **105**, 1 : 7-27 (R. CAILLEUX, P. JOLY, M.-Th. CERCEAU-LARRIVAL, J.P. BOIVIN et P. CALLAC).
- 1989 — Charalambos ZAMBETTAKIS (20 juillet 1917 — 17 mai 1989). *Bull. Soc. Mycol. France*, **105**, 4 : 295-307 (P. JOLY et D. LAMY).
- 1989 — « La collection viennoise de champignons en circ. donnée au Muséum National d'Histoire Naturelle en 1812 ou 1813 ». Texte dactylographié, non signé, s.l.n.d. (ca 1989) : 5 + XVI p.
- 1990 — Flux géniques par fusions de Buller dans une population de *Pleurotus eryngii*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **106**, 2 : 85-106 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1990 — La stérilité mâle pathologique, élément de la co-adaptation entre populations de champignons et de plantes-hôtes : modèle des Pleurotes des Ombellifères. *Bull. Soc. bot. France*, **137**, *Actualités bot.*, 2 : 71-85 (P. JOLY, R. CAILLEUX et M.-Th. CERCEAU).
- 1991 — *Guide des Champignons*. Paris, Hatier, « Collection Guide de la Nature », 254 p.
- 1991 — L'œuvre mycologique de Jean-Henri Fabre. In : *Les champignons de Jean-Henri Fabre*, C. CAUSSANEL Ed., Paris, Citadelles, (*L'art et la nature*) : 83-121.
- 1993 — *Pleurotus ostreatus* (Jacq. : Fr.) Kummer et *P. pulmonarius* (Fr.) Quéél. : Etudes préliminaires. *Bull. Soc. Mycol. France*, **109**, 1 : 27-41 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1993 — Etude de quelques stations épidémiques de *Pleurotus pulmonarius*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **109**, 4 : 199-221 (R. CAILLEUX et P. JOLY).

- 1994 — Etude de quelques stations endémiques de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Mycol. France*, **110**, 4 : 231-242 (R. CAILLEUX et P. JOLY).
- 1995 — Georges BECKER (7 février 1905 — 10 septembre 1994). *Bull. Soc. Mycol. France*, **111**, 2 : 83-90.

Les reproductions photographiques ont été réalisées par M. Dumont-Vialatte, Photographe au Laboratoire de Cryptogamie (M.N.H.N.), que nous remercions pour son concours.

VOLATILE COMPONENTS OF FRESH *AGROCYBE AEGERITA* AND *TRICHOLOMA SULFUREUM*

Sylvie RAPIOR^a, Sophie BREHERET^b, Thierry TALOU^b,
Yves PELISSIER^c, Michel MILHAU^c and Jean-Marie BESSIERE^d

^aLaboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Université Montpellier I,
Faculté de Pharmacie, 15 av. Charles Flahault, 34060 Montpellier cedex 2, France
Fax number: 33 (0) 467 411 940

E-mail: rapior@pharma.univ-montpl.fr

^bLaboratoire de Chimie agro-industrielle, Institut National Polytechnique de Toulouse,
Ecole Nationale Supérieure de Chimie, 118 route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex, France

^cLaboratoire de Pharmacognosie, Université Montpellier I, Faculté de Pharmacie,
15 av. Charles Flahault, 34060 Montpellier cedex 2, France

^dLaboratoire de Chimie appliquée, École Nationale Supérieure de Chimie,
8 rue de l'École Normale, 34296 Montpellier cedex 5, France

• Address for correspondence.

ABSTRACT: Two fresh wild mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Tricholoma sulfureum* were investigated for volatile components by headspace concentration, organic solvent extraction and water-distillation using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Thirty-one and forty-two volatile constituents were identified from *A. aegerita* and *T. sulfureum*, respectively. C₈ derivative (3-octanone), phenylethyl derivatives (2-phenylethanal, 2-phenylacetamide, 2-phenylcrotonaldehyde) and monoterpenes (α -pinene, linalool) were the main volatile components of fresh *A. aegerita*. 3-Hydroxybutan-2-one and 2-methylbutanol could have a role in the lees of wines flavour of this species. C₈ compound (1-octen-3-ol), benzene derivatives (ethylbenzene, styrene, xylene), monoterpenes (limonene, linalool) and indole derivatives were the major volatile compounds of *T. sulfureum*. Indole and 3-formylindole could be responsible for the gas-like odour of *T. sulfureum*. Comparison of extraction methods reveals large qualitative and quantitative differences in volatile metabolites for both fresh species.

KEY WORDS INDEX: Mushroom; *Basidiomycotina*; Volatile components; *Agrocybe aegerita*; *Tricholoma sulfureum*; Solvent extraction; Dynamic headspace concentration; Water distillation.

RÉSUMÉ: Les composés volatils de deux champignons sauvages frais, *Agrocybe aegerita* et *Tricholoma sulfureum* ont été étudiés par concentration des effluves, extraction par solvant et hydrodistillation, et identifiés par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse. *A. aegerita* et *T. sulfureum* présentent respectivement 31 et 42 composés volatils. L'octan-3-one, le 2-phényléthanal, le 2-phénylacétamide, le 2-phénylcrotonaldéhyde ainsi que les monoterpènes (α -pinène, linalol) sont les principaux composés des sporophores d'*A. aegerita*. La 3-hydroxybutan-2-one et le 2-méthylbutanol pourraient jouer un rôle dans l'odeur de lie de vin de ce champignon frais. Par ailleurs, l'oct-1-èn-3-ol, les dérivés benzéniques (éthylbenzène, styrène, xylène), les monoterpènes (limonène, linalol) et les dérivés indoliques sont les composés volatils majoritaires de *T. sulfureum*. L'indole et le 3-formylindole pourraient être responsables de l'odeur de gaz d'éclairage de *T. sulfureum*.

INTRODUCTION

For ages, mycologists have been sniffing to their specimens for determining species. Considering the unique and subtle odours of mushrooms and because more and more industries are turning to a search for novel sources for natural aroma components, general reviews on mushroom flavour (Claus, 1978; Maga, 1981; Mau *et al.*, 1994; Rapior *et al.*, 1998) and studies relative to specific mushroom odours have been reported such as the anise-like aroma of *Hydnellum suaveolens* (Wood *et al.*, 1988; Solberg, 1989) and *Clitocybe odora* (Breheret *et al.*, 1996), the almond-like odour of *Agaricus augustus* (Wood *et al.*, 1990), the sweet odour of *Hebeloma sacchariolens* (Wood *et al.*, 1992), the cucumber odour of some *Tricholomataceae* and *Entolomataceae* species (Wood *et al.*, 1994), the garlic-like aroma of *Marasmius alliaceus* (Rapior *et al.*, 1997a) and the coal-tar odour of *Tricholoma inamoenum* (Watson *et al.*, 1986).

Although the fresh mushrooms have characteristic aroma properties, few published studies exist on comparative methods for the volatile composition of headspace concentrate, solvent extract and distillate from edible and non-edible species (Vidal *et al.*, 1986; Buchbauer *et al.*, 1993). Comparison of volatile components from headspace concentrate and distillate was also reported by a few authors (Sulkowska & Kaminski, 1977; Yajima *et al.*, 1981; Charpentier *et al.*, 1986). Moreover, correlation between the odour and the profile of volatile components has been given little attention so far (Watson *et al.*, 1986; Rapior *et al.*, 1997a).

Only one study and none on volatile constituents was reported for odorous *Agrocybe aegerita* (Takama *et al.*, 1979) and *Tricholoma sulfureum* mushrooms, respectively. This paper focuses both on the extraction of volatile metabolites from fresh wild basidiocarps of *A. aegerita* and *T. sulfureum* by dynamic headspace concentration, organic solvent extraction and water-distillation, and identification of volatile substances using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS).

MATERIALS AND METHODS

Mushroom material

The fruit bodies representing a combination of young and old sporophores from two wild mushrooms, *Agrocybe aegerita* (Brig.) Fayod (= *Agrocybe cylindracea*, Poplar field cap) and *Tricholoma sulfureum* (Bull.:Fr.) Kummer (Gasworks Knight-cap) were collected in Fall 1996 in the South of France. *A. aegerita* is an edible mushroom with a fruity-wine flavour and *T. sulfureum* has a characteristic nauseating smell of gas (Courtecuisse & Duhem, 1994; Læssøe *et al.*, 1996). The fresh material was brushed clean of forest debris and treated immediately after collection.

Solvent extraction

The volatile components from 250 g of small mushroom cubes (approximately 100 mm³) were extracted with 400 ml of dichloromethane in 500 ml sealed Erlenmeyer flask (Rapior *et al.*, 1996, 1997b). After maceration for seven days, the organic layer was separated and traces of water removed with anhydrous sodium sulfate as a drying agent. The dichloromethane extract was then filtered through a glass funnel with Whatman n°1 filter paper and concentrated to 1 ml into a bottle with teflon lined cap using a nitrogen stream.

Dynamic headspace concentration

Fresh chopped mushrooms, i.e., 45 g of *A. aegerita* and 13 g of *T. sulfureum* were placed in a glass cell (0.25 l capacity) directly connected to a dynamic headspace concentrator (CHISA device-SGE). Volatile components were concentrated on Tenax trap with a stripping gas (Helium) with a constant flow rate set close to 30 ml/min for 20 min at room temperature. Samples were desorbed with a headspace injector (CHISA device-SGE) directly connected to the analytical column. The temperature of desorption was 210°C; the volatile components were cryofocused at -20°C in the column head before to be injected directly in the column (Breheret *et al.*, 1997).

Water-distillation

The finely chopped fresh materials, i.e., 50 g of *A. aegerita* and 300 g of *T. sulfureum*, were water-distilled in an original glass apparatus for 4 h. The condensed water-distillates were extracted with dichloromethane and the solvent then removed *in vacuo* (Pélissier *et al.*, 1995).

Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Analyses were carried out using a gas chromatograph (5892-Hewlett-Packard) and a mass selective detector (5971-Hewlett-Packard) with a potential of 70 eV for ionization by electron impact.

Solvent extraction and water-distillation analyses were performed by a 25 m × 0.23 mm × 0.13 µm dimethylpolysiloxane OPTIMA 1 (M-N) fused silica capillary column. The carrier gas was helium with a constant flow rate set close to 0.6 ml/min. The injector and detector temperatures were 200°C and 220°C, respectively. The column was temperature programmed as follows: 60°C (2 min) to 200°C (4°C/min).

Headspace analyses were performed by a 50 m × 0.22 mm × 1 µm dimethylpolysiloxane BP1 (SGE) fused silica capillary column. The carrier gas was helium and the pressure was fixed at 22 psi. The detector temperature was 250°C. The column was temperature programmed as follows: 50°C to 220°C (3°C/min).

Volatile component identification

The volatile constituents were identified by matching their mass spectra and retention indices with reference libraries (Stenhagen *et al.*, 1976; Jennings & Shibamoto, 1980; Adams, 1989; MacLafferty & Stauffer, 1989) and our own data bank.

RESULTS AND DISCUSSION

Volatile components of *A. aegerita*

The C₈ derivatives are the major volatile compound of fresh *A. aegerita* from headspace concentrate, organic extract and water-distillate. 3-Octanone (fungal-fruity odour) is the major component and 1-octen-3-ol (fungal odour) belongs to the minor fraction in the three extracts (Table 1) as described for *A. bisporus* headspace extract (Fischer & Grosch, 1987). These results are not in agreement with those reported by Takama *et al.* (1979) who described the volatile 1-octen-3-ol as the main volatile component of *A. aegerita* organic extracts.

The phenylethyl derivatives, i.e., 2-phenylethanal (floral-green odour), 2-phenylacetamide and 2-phenylcrotonaldehyde represented more than 24 % of the volatile fraction from the extract. Monoterpenes such as α -pinene (resinous odour) in headspace concentrate and linalool (fresh odour) in both extract and distillate were detected at low levels (Breheret *et al.*, 1997).

3-Hydroxybutan-2-one and 2-methylbutanol with their respective etherous-fruity and dairy notes were detected at high levels in the dynamic headspace concentrate of *A. aegerita*. Thus, these volatile constituents seemed to have a role in the lees of wine aroma of fresh *A. aegerita*.

Volatile components of *T. sulfureum*

The C₈ compounds are also the main volatile metabolites of fresh *T. sulfureum* from headspace concentrate, solvent extract and water-distillate. The major volatile component is 1-octen-3-ol in all extracts (Table 2).

The benzene derivatives (ethylbenzene, styrene, xylene, propenylbenzene) represented ca. 5% of the volatile fraction from headspace extract.

Monoterpenes i.e., α -pinene, sabinene, β -pinene and *p*-cymene were detected in headspace concentrate. Limonene and linalool were identified in the three extracts (Breheret *et al.*, 1997).

Both indole and 3-formylindole were identified in the dichloromethane extract. Indole (animal odour) that was also detected in the water-distillate, is probably responsible for the town gas odour of *T. sulfureum*. Indeed, this volatile constituent was previously reported by Hilber (1968) for *T. inamoenum* (Fr.) Quél., a mushroom described as having a smell of illuminating gas (Moser, 1983). On the other hand, a mixture of benzaldehyde, 1-octen-3-ol and phenylacetaldehyde could also be the basic components of the repulsive "coal tar" aroma of *T. sulfureum* as described for *T. inamoenum* by Watson *et al.* (1986) using sensory tests.

Volatile Compounds	BP1 column		Optima I column		
	RI ^a	Headspace Sample ^b	RI ^a	Solvent Extract	Steam Distillate
3-Hydroxybutan-2-one	707	16.1	715	0.2	
2-Methylbutanol	720	4.8	722	0.2	
Octene	785	7.8	789	0.3	
Ethylbenzene	850	2.1			
<i>p</i> - and/or <i>m</i> -Xylene	860	0.3			
Styrene	878	1.8	859	2.8	0.5
<i>o</i> -Xylene	883	0.1			
α -Pinene	938	0.3			
Benzaldehyde			938	0.8	0.2
1-Octen-3-one			958	0.9	2.2
1-Octen-3-ol	965	0.1	966	0.5	0.3
3-Octanone	966	64.5	962	47.9	37.6
3-Octanol	980	0.7	983	6.3	26.2
<i>p</i> -Cymene			1020		0.3
2-Phenylethanal			1024	1.1	0.8
Limonene			1028		0.1
(<i>E</i>)-2-Octenal			1038	0.1	0.2
(<i>E</i>)-2-Octenol			1056	1.9	11.1
Octanol			1060		4.6
Linalool			1095	2.0	0.9
2-Phenylethanol			1106	11.0	8.7
(<i>E</i>)-Non-2-enal			1136		0.1
2-Phenylcrotonaldehyde			1250	1.4	
Undecan-2-one			1293		0.1
(2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-Decadienal			1304	0.1	0.2
2-Phenylacetamide			1330	11.5	
(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-Decadienal			1345	0.3	0.7
4-Hydroxybenzaldehyde			1400	1.1	
3-Formylindole			1675	10.3	
Tetradecanol			1676	0.3	0.1
Pentadecan-2-one			1695	1.0	0.2

^aDifferent retention indices due to the GC column used; ^bRelative percentage of the identified volatile based on the GC/MS chromatographic area

Table 1. Volatile composition (percentage) of three extracts from *A. aegerita*

Volatile Compounds	BP1 column		Optima 1 column		
	RI ^a	Headspace Sample ^b	RI ^a	Solvent Extract	Steam Distillate
Hexan-2-ol			781	0.4	
Octene	785	3.9	789	0.1	
(Z)-1,3-Octadiene	817	3.0	823	0.1	
Ethylbenzene	850	1.7			
<i>p</i> — and/or <i>m</i> -Xylene	860	0.7			
Styrene	878	2.2	959	0.2	0.5
<i>o</i> -Xylene	883	0.2			
2-Propenylbenzene	934	0.2			
Benzaldehyde			938	3.7	6.2
α -Pinene	938	0.4			
Camphene	953	0.1			
1-Octen-3-one	956	0.8	958	3.1	5.3
1-Octen-3-ol	965	64.2	966	43.3	50.7
3-Octanone	966	11.5	962	0.2	0.8
Sabinene	972	0.1			
β -Pinene	979	0.1			
3-Octanol	980	2.6	980	0.3	0.5
2-Pentylfuran			986	0.1	
<i>p</i> -Cymene			1022		0.1
β -Phellandrene	1028	0.6	1025	0.5	
Limonene	1028	0.6	1026	0.6	1.4
2-Phenylethanol			1028	0.2	0.2
Benzyl alcohol			1035	2.0	0.5
(<i>E</i>)-2-Octenol	1049	0.5	1056		3.5
Octanol	1052	0.7	1060	0.4	1.9
(<i>E</i>)-Oct-3-en-1-ol			1062		3.7
Linalool	1084	0.8	1095	0.2	0.4
Undecene	1084	0.1			
Nonan-2-one			1090		0.1
2-Phenylethanol			1106	2.9	1.7
1,3-Undecadiene	1136	2.0			
Decan-2-one			1191		0.1
2-Phenylcrotonaldehyde			1250	0.7	
(<i>E</i>)-2-Decenal			1253	0.5	1.2
Undecan-2-one			1293		0.1
Indole			1320	3.4	15.8
2-Phenylacetamide			1330	24.1	
Gamma-nonolactone			1355		0.5
4-Hydroxybenzaldehyde			1416	5.1	
Benzopyrrolidone			1452	1.8	
Nerolidol			1565		0.2
3-Formylindole			1675	1.8	

^aDifferent retention indices due to the GC column used; ^bRelative percentage of the identified volatile based on the GC/MS chromatographic area

Table 2. Volatile composition (percentage) of three extracts from *T. sulfureum*

Effect of extraction method on volatile composition

Three main isolation techniques were used, i.e., dynamic headspace concentration, liquid solid extraction into a organic solvent and water-distillation for the investigation of volatile substances from fresh *A. aegerita* and *T. sulfureum*. Only the volatile components unambiguously identified by both GC and MS methods are reported in Tables 1 and 2.

The organic extracts from fresh mushrooms contained many primary and secondary metabolites such as lipids, sterols and fatty acids (Regerat *et al.*, 1976; De Simone *et al.*, 1979; Senatore *et al.*, 1988; Bonzom *et al.*, 1995). Tables 1 and 2 list the volatilizable metabolites detected in our GC/MS experiments at 200°C (injector temperature) from the organic solvent extracts. The water-distillate of fresh mushrooms contained both low and high volatile metabolites of fresh mushrooms. The headspace concentrates contained only volatile components with low volatility indice at room temperature. Thus, only the most volatile constituents of fresh mushrooms are detected at high levels in the headspace concentrates. It is why low molecular weight benzene derivatives, i.e., ethylbenzene, xylenes and styrene as well as monoterpenes are commonly identified in headspace extracts and more rarely reported in solvent extracts and distillates from fresh mushrooms.

Consequently, the volatile composition of mushroom extracts and water-distillates is close to the genuine composition of volatile constituents in fresh mushrooms. Indeed, the major volatile components of solvent extracts are similar to those of water-distillates as reported in Tables 1 and 2. Therefore, qualitative differences appeared for some aliphatic alcohols; 3-octanol, (*E*)-2-octenol and octanol levels are much lower in the extracts of both fresh mushrooms studied than in the water-distillates. These C₈ derivatives could be present in a linked form in mushrooms; water-distillation should be then responsible for the free aliphatic alcohols formation as already reported by Cravo *et al.* (1993).

In conclusion, many volatile secondary metabolites are produced by mushrooms. The volatile composition of *A. aegerita* and *T. sulfureum* is directly dependent of the extraction process as already described for other mushroom species (Charpentier *et al.*, 1986; Vidal *et al.*, 1986). Thus, the headspace concentrates, organic extracts and water-distillates of *A. aegerita* and *T. sulfureum* are attractive natural resources for aroma application in food, pharmacy and cosmetic industries.

ACKNOWLEDGMENTS: F. Gasc (glass-blower) is gratefully acknowledged for helpful conception and realization of well-adapted water-distillation apparatus.

REFERENCES

- ADAMS R.P., 1989 — *Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy*. Academic Press Inc., San Diego, 469 p.
- BONZOM P., ZLOH M., BALDEO W., NICOLAOU A. & GIBBONS W. A., 1995 — NMR Lipids Profiles of Common Mushrooms. *Transactions of the biochemical society* 23: 613S.
- BREHERET S., TALOU T., RAPIOR S. & BESSIERE J. M., 1996 — Analyse comparative de l'arôme du Clitocybe vert (*Clitocybe odora*) par extraction au solvant et analyse des

- effluves. *Rivista Italiana Eppos (Numéro Spécial-14^e Journées Internationales sur les Huiles essentielles)*: 448-457.
- BREHERET S., TALOU T., RAPIOR S. & BESSIERE J. M., 1997 — Monoterpenes in the Aromas of Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 831-836.
- BUCHBAUER G., JIROVETZ L., WASICKY M. & NIKIFOROV A., 1993 — Zum Aroma von Speisepilzen. Kopfraum-Analyse mittels GC/FID und GC/FTIR/MS. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197: 429-433.
- CHARPENTIER B. A., SEVENANTS M. R. & SANDERS R. A., 1986 — Comparison of the effect of extraction methods on the flavor volatile composition of shiitake (*Lentinus edodes*) via GC/MS and GC/FTIR. In: Charalambous G (ed.), *The Shelf Life of Foods and Beverages. Proceedings of the 14th International Flavor Conference, Rhodes, Greece, 23-26 July 1985*, Elsevier Sci. Publ. B.V., Amsterdam, pp. 413-433.
- CLAUS G., 1978 — Des odeurs en Mycologie. *Documents mycologiques*, VIII (30-31): 31-63.
- COURTECUISSIE R. & DUHEM B., 1994 — *Guide des champignons de France et d'Europe*. Eds. Delachaux et Niestlé, Lausanne, 476 p.
- CRAVO L., PERINAU F., GASET A. & BESSIERE J.M., 1993 — Study of the Chemical Composition of the Essential Oil, Oleoresin and its Volatile Product obtained from Ambrette (*Abelmoschus moschatus* Moensch) seeds. *Flavour and fragrance journal* 7: 65-57.
- DE SIMONE F., SENATORE F., SICA D. & ZOLLO F., 1979 — Sterols from some Basidiomycetes. *Phytochemistry* 18: 1572-1573.
- FISCHER K. H. & GROSCHE W., 1987 — Volatile Components of Importance in the Aroma of Mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 20: 233-236.
- HILBER O., 1968 — Indol als hauptkomponente des geruches einiger *Tricholoma*-arten und von *Lepiota bucknallii*. *Zeitschrift für Pilzkunde* 34: 153-158.
- JENNINGS W. & SHIBAMOTO T., 1980 — *Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography*. Academic Press, New York, 472 p.
- LÆSSOE T., LINCOFF G. & DEL CONTE A., 1996 — *The Knopf mushroom book*. A.A. Knopf Canada, Toronto, 256 p.
- MACLAFFERTY, F. W. & STAUFFER D. B., 1989 — *The Wiley NBS Registry of Mass Spectral Data*. Wiley J. & Sons, New York, 256 p.
- MAGA J. A., 1981 — Mushroom Flavor. *Journal of agricultural and food chemistry* 29: 1-4.
- MAU J., BEELMAN R.B. & ZIEGLER G. R., 1994 — *Aroma and Flavor Components of cultivated mushrooms*. In: Charalambour G. (ed.). *Spices, Herbs and Edible Fungi*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 657-684.
- MOSER M., 1983 — *Keys of Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales)*. Ed. Phillips R., London, 535 p.
- PELISSIER Y., MALAN K., MAHMOUT Y & BESSIERE J. M., 1995 — Volatile components of *Landolphia heudelotii* A. DC. and *Saba senegalensis* (A. DC.) Pichon. *Journal of essential oil research* 8: 299-301.
- RAPIOR S., CAVALIE S., ANDARY C., PELISSIER Y., MARION C. & BESSIERE J. M., 1996 — Investigation of Some Volatile Components of Seven Fresh Wild Mushrooms (Basidiomycetes). *Journal of essential oil research* 8: 199-201.
- RAPIOR S., BREHERET S., TALOU T. & BESSIERE J. M., 1997a — Volatile Flavor Constituents of Fresh *Marasmius alliaceus* (Garlic *Marasmius*). *Journal of agricultural and food chemistry* 45: 820-825.
- RAPIOR S., MARION C., PELISSIER Y. & BESSIERE J. M., 1997b — Volatile Composition of Fourteen Species of Fresh Wild Mushrooms (Boletales). *Journal of essential oil research* 9: 231-234.
- RAPIOR S., FRUCHIER A. & BESSIERE J. M., 1998 — *Volatile Aroma Constituents of Agarics and Boletes (A Review)*. In: Pandalai S.G. (ed.). *Recent Research Developments in Phytochemistry*. Research Signpost Publ., Trivandrum, India (in press).

- REGERAT F., POURRAT H. & POURRAT A., 1976 — Recherche de l'ergostérol dans les carpophores de quelques Macromycètes. *Annales pharmaceutiques françaises* 34: 231-235.
- SENATORE F., DINI A. & MARINO A., 1988 — Chemical Constituents of Some Basidiomycetes. *Journal of the science of food and agriculture* 45: 337-345.
- SOLBERG Y., 1989 — Chemical Components of the Spine Fungi *Hydneum suaveolens* and *Hydneum aurantiacum*. *Cryptogamic botany* 1: 145-146.
- STENHAGEN E., ABRAHAMSSON S. & MACLAFFERTY F.W., 1976 — *Registry of Mass Spectral Data*. Wiley J & Sons, New York, tome 1: 816 p.
- SULKOWSKA J. & KAMINSKI E., 1977 — Effects of different drying methods on quality and content of aromatic volatiles in dried mushrooms *Agaricus bisporus*. *Acta alimentaria Polonica* 3: 409-425.
- TAKAMA F., SASAKI M. & NUNOMURA N., 1979 — Flavor components of *Agrocybe aegerita* (*Yanagi-Matsutake*). In: Delmas J. (ed.) Mushroom Science X (Part II). Proceedings of the Tenth International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Bordeaux, France, 1978, INRA Publ., Bordeaux, pp. 677-684.
- VIDAL J. P., TOULEMONDE B. & RICHARD H., 1986 — Constituants volatils de l'arôme d'un champignon comestible: le mousseron (*Marasmius oreades*). *Lebensm.-Wiss. u. -Techol.* 19: 353-359.
- WATSON R. L., LARGENT D. L. & WOOD W. F., 1986 — The "coal tar" odor of *Tricholoma inamoenum*. *Mycologia* 78: 965-966.
- WOOD W. F., DESHAZER D. A. & LARGENT D. L., 1988 — The identity and metabolic fate of volatiles responsible for the odor of *Hydneum suaveolens*. *Mycologia* 80: 252-255.
- WOOD W. F., WATSON R. L. & LARGENT D. L., 1990 — The Odor of *Agaricus augustus*. *Mycologia* 82: 276-278.
- WOOD W. F., BROWNSON M. & SMUDDE R. A., 1992-2-aminobenzaldehyde: the source of the "sweet odor" of *Hebeloma sacchariolens*. *Mycologia* 84: 935-936.
- WOOD W. F., BRANDES M. L., WATSON R. L., JONES R. L. & LARGENT D. L., 1994 — Trans-2-nonenal, the Cucumber Odor of Mushrooms. *Mycologia* 86: 561-563.
- YAJIMA I., YANAI T., MAKAMURA M., SAKAKIBARA H. & HAYASHI K., 1981 — Volatile flavor compounds of Matsutake — *Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. *Agricultural and biological chemistry* 45: 373-377.

RESPONSES OF *ASPERGILLUS CARBONARIUS* TO TWEEN 80. MYCELIAL GROWTH, PROTEIN, RNA AND CHITIN CONTENT.

Fragiskos GAITIS

University of Athens, Institute of General Botany,
Pan/polis, Ilisia 157 84, Athens Greece.

*This paper is dedicated to my Professor Dr S. Marakis

ABSTRACT : Studies were carried out to investigate the effects of the surfactant Tween 80 on spore germination, mycelial growth and form of *Aspergillus carbonarius* and its protein, RNA and chitin content. The presence of increasing (0.2-1.1%) Tween 80 concentrations in the medium: a) reduced the spore germination time from 24h (in the control) to 3h, b) reduced hyphal diameter and chitin content while hyphal branching frequency was increased resulting in the formation of soft, loose and large pellets and c) increased the mycelium dry weight while its protein and RNA content (%) was reduced.

KEY WORDS: Tween 80, germination, hyphal growth unit (G), *Aspergillus carbonarius*

RÉSUMÉ: Des études, concernant les effets du Tween 80 sur la germination des spores, la forme et la croissance du mycélium d'*Aspergillus carbonarius*, ainsi que sur son contenu en protéines, RNA et chitine, ont été entreprises. Des concentrations croissantes de Tween 80 ont pour conséquences : a) une réduction du temps de germination des spores de 24h à 3h ; b) une diminution du diamètre des hyphes et du contenu du mycélium en chitine, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des ramifications ayant pour conséquence la formation de « pellets » lâches, de grande taille ; c) l'augmentation du poids sec de mycélium et une diminution du contenu (en %) du mycélium en protéines et en RNA.

MOTS CLEFS: Tween 80, germination, unité de croissance hyphale (G), *Aspergillus carbonarius*.

INTRODUCTION

Several organic compounds [aliphatic acids (mainly unsaturated), alcohols, aldehydes and surfactants] have been found to affect growth, mycelial form and enzyme production (amylase, cellulase, sucrase, ligninase etc.) of many fungi (Takahashi *et al.*, 1960; Fries, 1973; Rao & Rao, 1975; Panda *et al.*, 1987; Asther *et al.*, 1987; Marakis, 1988; Gomez-Alarcon *et al.*, 1989).

Surfactants, in general, such as Tween 20, Tween 80 etc., modify protein-lipid interactions, solubilize specific proteins and lipids from membranes, lower the surface tension of liquids and alter membrane permeability (Helenius & Simons, 1974).

Since sorbitan polyoxyethylene monooleate (Tween 80) is of great importance in various fungal biotechnological processes because it can stimulate and increase the production and activity of several enzymes (Asther *et al.*, 1987; Gomez-Alarcon *et al.*, 1989) or increase alcohol volumetric productivity in a continuous alcohol fermentation (Torrice & Acevedo, 1988) and as a basic constituent of detergents thrown in the environment (seas, rivers etc.) might affect fungal growth, a study of Tween 80 effects on fungal growth physiology is needed.

Important parameters of fungal growth are: a) the spore germination time, since it determines the lag phase time, b) the morphological form of the mycelium because from changes in the morphology, a whole range of biochemical changes and alterations of culture physical properties take place and c) the protein content, since the produced biomass could be used as animal feed (Marakis, 1988).

To the best of our knowledge there is very little information concerning the effects of Tween 80 on fungal growth physiology. Marakis (1988) observed an increase in mycelium dry weight and total mycelial protein as well as the uptake rate of the carbon and nitrogen sources when Tween 80 (2.5 g/litre) was added in culture media of *Rhizopus nigricans* and *Penicillium frequentans*. So far, studies reported by others focus to Tween 80 effects on enzymic productions or activities. Asther *et al.* (1987) showed ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12 when Tween 80 was supplemented to the culture medium. Gomez-Alarcon *et al.* (1989) showed a beneficial effect of Tween 80 in increasing yields of various extracellular enzymes of *Pycnoporus cinnabarinus*.

The aim of this study was to investigate some biochemical and morphological changes induced in *Aspergillus carbonarius* growing under high Tween 80 concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism:

A strain of *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom isolated from carob bean storehouse soil (Gaitis, 1995) was used.

Components*	Media g l ⁻¹					
	M	T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Sucrose	20	—	20	20	20	20
Tween 80	—	10	2	5	8	11

* All media contained (g l⁻¹): (NH₄)₂SO₄: 5; KCl: 0.5; MgSO₄·7H₂O: 0.5; K₂HPO₄: 1; FeSO₄·7H₂O: 0.01.

Table 1. Culture media (g l⁻¹) used for cultivation of *A. carbonarius*.

Culture media:

For the batch cultures six media were used (Table 1). The pH was adjusted at 5.0-5.5. All culture media were sterilized by autoclaving (15 min, 121°C).

Inoculum preparation:

Peripheral growth zone spores from Czapek-Dox agar cultures were obtained after 5 days of incubation at 30°C. Spores were suspended in quarter-strength Ringer's solution for 1 min in a Waring blender.

Batch cultivation:

A. carbonarius was grown in three 100 ml Erlenmeyer flasks containing 30 ml of medium. These flasks were inoculated with 3×10^3 spores ml^{-1} of medium and incubated at 30°C for 7 days on a rotary shaker (160 rpm).

Spore germination:

Spores were considered to be germinated when their germ tube lengths were one-half of the spore diameter.

Harvesting and drying of biomass:

For the protein, chitin and RNA determination the mycelial mats were harvested by filtration through Whatman No 1 filter paper. Then they were thoroughly washed twice with 25 ml distilled water and freeze-dried to a constant weight.

Microscopic observations:

Measurements of hyphal diameter and branching frequency: For microscopic observations, pellets from the cultures were filtered, washed and resuspended for 5 min at 20°C in 0.5N NaOH to separate hyphal clumps. Then the separated hyphae of pellets were placed on slides and measurements were made using a calibrated eyepiece in a Zeiss light microscope (Katz *et al.*, 1972; Morrison & Righelato, 1974).

The hyphal growth unit (G) was determined by the procedure of Trinci (1974):

$$G = \frac{\text{Total length of mycelium } (\mu\text{m})}{\text{Number of tips}}$$

Analytical methods:

— Mycelium chitin was determined according to Plassard *et al.* (1982) method based on the determination of glycosamine by HNO_3 transforming it into 2,5-anhydromannose; this compound reacts with the 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone

hydrochloride (MBTH) producing, in the presence of ferric chloride solution an intense blue colour best absorbed at 653nm.

— The RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260nm of a previously HClO₄ extracted and KOH digested mycelium (Benthin *et al.*, 1991).

— Protein content was estimated by the method of Gorsuch & Norton (1969).

Statistical analysis:

The data were calculated as the arithmetic mean of 10 replications ± standard error of the mean.

RESULTS AND DISCUSSION

Tween 80 effects on the spore germination time, hyphal diameter, hyphal growth unit and morphology of *Aspergillus carbonarius* are shown in Table 2.

No mycelial growth in medium T, which contained Tween 80 as sole carbon source, was observed. This means that *A. carbonarius* cannot utilize Tween 80 as carbon source. Our data are in agreement with those of Marakis (1988) and Fries (1973), who reported that the presence of small amounts of aliphatic fatty acids, aldehydes etc., promoting mycelium growth, could not act as nutrients.

Spore germination:

Spore germination time in media containing Tween 80 was 8 times shorter compared to that in medium M without this surfactant. This promotion is probably due to the ability of Tween 80 to promote both uptake and exit of compounds from the cell through modification of plasma membrane permeability (Reese & Maguire, 1969; Marakis, 1988).

Media	Spore germination time (h)	Length of G (µm)	Hyphal diameter (µm)	Mycelium form (mm)
M	24.00	112.7 ± 1.3	6.6 ± 0.1	pellets=2.10 ± 0.26
T ₁	3.00	88.0 ± 1.8	3.4 ± 0.1	pellets=2.31 ± 0.14
T ₂	3.00	87.4 ± 1.8	3.4 ± 0.1	pellets=2.50 ± 0.12
T ₃	3.00	63.3 ± 1.7	2.8 ± 0.2	pellets=2.70 ± 0.15
T ₄	3.00	64.0 ± 1.2	2.8 ± 0.1	loose-large floculent masses

Table 2. Effects of Tween 80 on spore germination time, hyphal growth unit (G), hyphal diameter and macroscopic morphology of mycelium (pelletal, filamentous) of *A. carbonarius* cultured in synthetic liquid media with or without Tween 80.

Mycelial growth:

Mycelium dry weight was increased by 5-20% (depending on Tween 80 concentration) compared to the dry weight of medium M (Table 3). Biomass increase might happen because of the alteration of the cell wall permeability resulting in a better nutrient inwards defusion.

The percentage of protein and RNA content was reduced by the presence of Tween 80 as compared to medium M (Table 3). The reduction of the percentage of protein and RNA content cannot be explained as a block of the proteinsynthetic ability of *A. carbonarius*, but it is most likely that proteins are reduced through solubilization by Tween 80 treatment (Helenius & Simons, 1974). However, this reduction might be due to the distribution of the same amount of proteins and RNA into greater amounts of produced mycelial biomass.

Mycelium morphology:

Hyphal growth unit (G), hyphal diameter, pellet character and chitin content of *A. carbonarius* were affected by Tween 80 (Tables 2, 3). Thus:

a) The G length measured on young mycelia early in the growth phase and in hyphae in the center and periphery of the pellets after 7 days of incubation, were found to be almost unchanged. The length of G ranged between 64.0 to 112.7 μm . A reduction of G length in media T₁-T₄, with increasing Tween 80 concentrations, was observed. Marakis (1988) found higher G lengths of *P. frequentans* and *R. nigricans* in the presence of Tween 80. Thus, the G length should depend on fungal strain and culture conditions.

b) The hyphal diameter was reduced by the presence of increasing concentrations of Tween 80 (3.4-2.8 μm) as compared to that of medium M (6.6 μm). This hyphal thinning can be attributed to the reduction of the chitin content, since the cell wall of *A. carbonarius* belongs to the chitin-glucan group (Bartnicki-Garcia, 1968). In the presence of Tween 80 the hyphal chitin content was lower (4-72%) compared to that determined in hyphae grown in medium M. Chitin content reduction is possibly due to Tween 80 effect on chitin synthetase synthesis or activity.

Media	Dry weight (mg)	Protein content % on dry weight	Chitin content mg g ⁻¹ of mycelium	RNA (%)
M	190.0 ± 4.8	33.8	290.0	2.6
T ₁	200.0 ± 2.4	25.0	278.5	1.6
T ₂	208.0 ± 23.9	24.4	271.4	1.7
T ₃	212.8 ± 4.2	24.1	214.3	1.9
T ₄	229.5 ± 5.7	24.0	169.0	1.9

Table 3. Tween 80 effects on mycelium dry weight, protein, RNA and chitin contents of *A. carbonarius* cultured in synthetic liquid media with or without Tween 80.

c) The mycelium in medium M formed dense compact regular pellets (Fig. 1A), whereas under the presence of Tween 80 (media T₁-T₄) pellets were soft, irregularly shaped and aggregated into loose large flocculent masses as shown in Fig. 1B. It is noticeable that

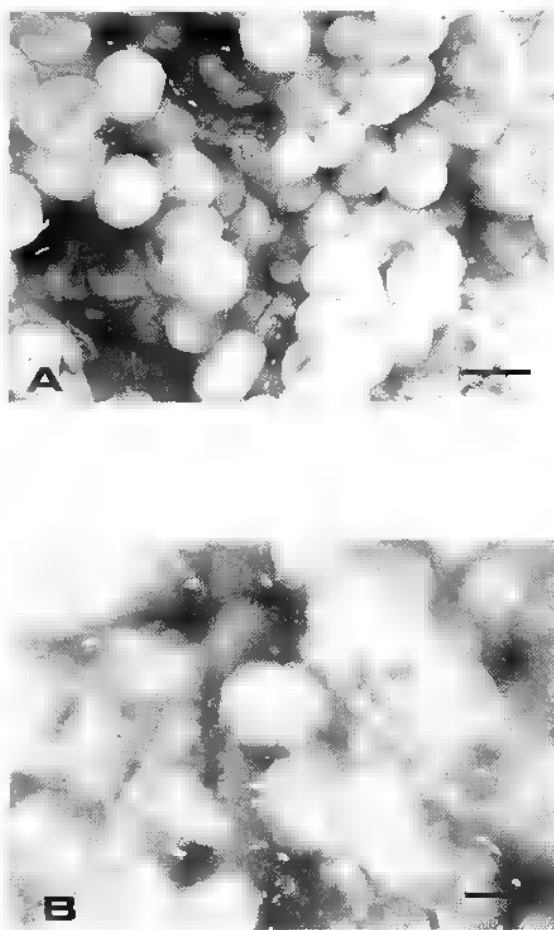


Fig. 1 — Tween 80 effects on *Aspergillus carbonarius*. A. Dense, compact, regular pellets produced in medium M. B. Soft, loose, irregularly shaped pellets produced in medium T₃. Bar = 2mm.

autolytic process was not observed in the pellet center and consequently no proteins were determined in the culture filtrate.

The reduction of the hyphal diameter resulted in the breakage of hyphae which does not favor the formation of dense compact pellets. Our results, concerning the pellet formation, are not in agreement with those of Righelato (1975) and Marakis (1988) probably because they did not take into account the hyphal diameter, a factor that can alter the hyphal mechanical resistance (rigidity). It is known that the cell wall of the most fungi

is built up of interwoven microfibrils of chitin cemented by an amorphous matrix material. This structure affords a hyphal rigidity. So, when the skeletal component of the hyphae is reduced, the hyphal rigidity may become weaker resulting in an easier hyphal breakage during agitation of the culture (Gaitis & Marakis, 1994).

CONCLUSION

The reduction of the time needed for spore germination of *A. carbonarius* in the presence of Tween 80, is a very important result from a practical point of view, since it might contribute to the confrontation of problems (eg. production cost) due to a long lag phase of fungal spores used for the production of a fungal product with biotechnological processes.

The effect of Tween 80 on the germination time of fungal spores, should alert those scientists who are concerned with fungal growth for continuing the use of this surfactant as a soaking agent for the production of inoculum of spores since, even in very low amounts, it reduces the lag phase and generally affects the fungal growth (mycelium production and morphology, protein and RNA content etc.).

The presence of Tween 80 seriously affected the mycelium morphology, which is of considerable importance to the overall physicochemical environment within the fermenter, affecting this way the quality and production cost of a microbial product. So, the desirable mycelial form could be defined by addition or not of a proper amount of Tween 80 in culture medium.

ACKNOWLEDGEMENTS: The author would like to thank Dr G. Ouzounidou for encouragement and suggestions in preparing the manuscript.

REFERENCES

- ASTHER M., CORRIEU G., DRAPRON R. & ODIER E., 1987 — Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12. *Enzyme microbiology and technology* 9: 245-249.
- BARTNICKI-GARCIA S., 1968 — Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Symposium society of general microbiology* 23: 245-267.
- BENTHIN S., NIELSEN J. & VILLADSEN J., 1991 — A simple and reliable method for the determination of cellular RNA content. *Biotechnology techniques* 5(1): 39-42.
- FRJES N., 1973 — Effect of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. *Transactions of the british mycological society* 60: 1-21.
- GAITIS F., 1995 — *Effect of chemical compounds (tannins, tween 80, heavy metals) on mycelium morphology and protein content of Aspergillus carbonarius*. Ph.D. Thesis. University of Athens.
- GAITIS F. & MARAKIS S., 1994 — Tannic acid effects on spore germination time and mycelial morphology of *Aspergillus carbonarius*. *Micologia neotropical aplicada* 7: 5-16.
- GOMEZ-ALARCON G., SAIZ-JIMENEZ C. & LAHOZ R., 1989 — Influence of Tween 80 on the secretion of some enzymes in stationary cultures of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbios* 60: 183-192.

- GORSUCH T.T. & NORTON R.L., 1969 — The determination of protein in biological materials and foodstuffs. *Journal of food technology* 4: 1-6.
- HELLENIOUS A. & SIMONS K., 1974 — Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et biophysica acta* 415: 29-79.
- KATZ D., GOLDSTEIN D. & ROSENBERGER R.F., 1972 — Model for branch initiation in *Aspergillus nidulans* based on measurements of growth parameters. *Journal of bacteriology* 109(3): 1097-1100.
- MARAKIS S., 1980 — *New fungal strains for microbial protein production from carob beans*. Ph. D. Thesis. University of Athens.
- MARAKIS S., 1988 — Growth and protein content of the mycelium of *Rhizopus nigricans* and *Penicillium frequentans* cultured in synthetic media with or without Tween 80. *Biologia gallohellemica* 14: 17-25.
- MORRISON K. B. & RIGHELATO R. C., 1974 — The relationship between hyphal branching, specific growth rate and colony radial growth rate in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of general microbiology* 81: 517-520.
- PANDA T., GRUBER H. & KUBICEK C. P., 1987 — Stimulation of protein secretion in *Trichoderma reesei* by Tween surfactants is not correlated with changes in enzyme localization or membrane fatty acid composition. *FEMS microbiology letters* 41: 85-90.
- PLASSARD C. S., MOUSAIN D. G. & SALSAC L. E., 1982 — Estimation of mycelial growth of basidiomycetes by means of chitin determination. *Phytochemistry* 21: 345-348.
- RAO K. K. & RAO S., 1975 — Effect of Tweens on the production of ergot alkaloids by *Aspergillus fumigatus*. *Folia microbiologica* 20: 418-422.
- REESE E. T. & MAGUIRE A., 1969 — Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied microbiology* 17: 242-245.
- RIGHELATO R.C., 1975 — *Growth kinetics of mycelial fungi*. In: *The filamentous fungi* Vol. I. Industrial mycology. Eds J.E. Smith & D.R. Berry. pp. 79-103.
- TAKAHASHI J., ABEKAWA G. & YAMADA K., 1960 — Effect of non-ionic surface active agents on micelial form and amylase production of *Aspergillus niger*. *Nippon nozei kogaku korishi* 34: 1043-1045.
- TORRICO D. & ACEVEDO F., 1988 — Effect of agitation and Tween 80 addition in the continuous alcohol fermentation. *MIRCEN journal* 4: 393-399.
- TRINCI A. P. J., 1974 — A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *Journal of general microbiology* 81: 225-236.

SCREENING OF ANTIMICROBIAL ACTIVITIES BY AQUATIC HYPHOMYCETES CULTIVATED ON VARIOUS NUTRIENT SOURCES.

G. PLATAS, F. PELÁEZ, J. COLLADO, G. VILLUENDAS and M. T. DÍEZ

Centro de Investigación Básica.
Merck, Sharp & Dohme de España, S. A.
Josefa Valcárcel, 38-28027 Madrid (Spain)

Fax 34 1 3210 614
gonzalo-platas@merck.com

ABSTRACT. — Twenty-six strains belonging to 19 species of aquatic hyphomycetes isolated from freshwater streams in Spain were tested for antimicrobial activities after cultivation on 24 different solid media. Fifteen of these cultures produced antibacterial activities and 8 produced antifungal activities in at least one medium. The most successful media were those with a low nitrogen/carbon ratio. The ecological and biotechnological implications of these results are discussed.

KEY WORDS : antibacterials, antifungals, ingoldian fungi, production media.

RÉSUMÉ. — Trente six souches de 19 espèces d'hyphomycètes aquatiques, isolées de rivières d'Espagne, ont été testées pour leur activité antimicrobienne sur 24 milieux de culture différents. Quinze de ces souches présentent une activité antimicrobienne et 8 une activité antifongique, sur au moins un milieu. Les meilleurs milieux sont ceux présentant le plus faible rapport azote/carbone. Les implications écologiques et biotechnologiques de ces résultats sont discutées.

MOTS CLEFS : antibactérien, antifongique, ingoldien, milieu

INTRODUCTION

The significant nutritional and environmental differences between aquatic and terrestrial habitats could select for the development of secondary metabolic pathways in aquatic fungi, that differ from those of other fungi. During this last decade, surveys of different aquatic habitats for novel secondary metabolite producers, have resulted in the identification of several species of fungi that synthesize previously undiscovered biologically active compounds. Some examples of the organisms isolated from different aquatic sources are *Microascus longirostris* Zukal (Yu *et al.*, 1996) directly isolated from water;

marine animal parasites or commensals like *Phoma* sp. (Sugano *et al.*, 1991); fungi isolated from seaweeds like *Leptosphaeria* sp. (Takahashi *et al.*, 1995a, 1995b), *Asteromyces cruciatus* F. et F. Moreau ex Hennebert (Shin & Fenical, 1987); or endophytes like *Leptosphaeria obiones* (Crouan & Crouan) Saccoro (Poch & Gloer, 1989b) and *Helicascus kanaloanus* Kohlmeyer (Poch & Gloer, 1989a). Most of these organisms were isolated from marine samples, although only some could be considered true marine fungi.

However, other aquatic ecosystems have been less reported or investigated as sources for potential producers of biologically active natural products. This is the case for freshwater habitats and aquatic hyphomycetes, a taxonomically and phylogenetically heterogeneous group of fungi that constitute the dominant group of organisms colonizing deciduous leaves and submerged woods in freshwater courses. It has been reported that this group of organisms is able to produce substances with biotechnological applications, such as enzymes (xylanases, pectinases, proteases, etc.) (Suberkropp, 1992). Nevertheless, although some ecological evidence suggests that members of this group produce diffusible inhibitory substances (Shearer & Zare-Maivan, 1988; Fisher & Anson, 1983), only two active compounds have been fully characterized up to date: kirschsteinin, a cytotoxic compound isolated from *Kirschteiniothelia elaterascus* Shearer (Poch & Gloer, 1992), and anguillosporal, an antibacterial and antifungal compound isolated from *Anguillospora longissima* (Sacc. & Syd) Ingold (Harrigan *et al.*, 1995).

Also, the ecological characteristics shared by these aquatic hyphomycetes could make them share their metabolic response to different growth conditions, in spite of their phylogenetic heterogeneity. The goal of the present work is to determine the influence of nutrients on the production of antimicrobial activities by these fungi. The information obtained from these experiments is expected to be applicable to the design of production media to be included in a screening of natural products from aquatic fungi. With this purpose, we selected for this study 26 fungal strains, belonging to 19 species of aquatic hyphomycetes isolated from freshwater streams in several locations in Spain.

To study the influence of nutrients on the production of diffusible antimicrobial compounds, the fungi were grown on 24 different agar media formulated with complex sources commonly used in fungal fermentations. The choice of using these complex sources for this experiment, instead of chemically defined media, is because they usually produce a better yield of secondary metabolites. The production of antimicrobial activities against a representative bacterium (*Bacillus subtilis*), and a representative fungus (*Aspergillus fumigatus*) was evaluated after two and four weeks of incubation.

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains :

The aquatic hyphomycetes used for this study (Table 1) were monosporic isolates collected from different freshwater streams in Spain, stored at CIBE (Centro de Investigación Básica España) culture collection. The selection of the cultures to be studied was performed to achieve both a large number of species and a high range of taxonomic variability, as it is shown by the identified teleomorphs.

Table 1. Cultures studied and its teleomorph.

Strain code	Species	Collection place	Teleomorph
FP 189	<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	Madrid	Unknown
FP 400	<i>Alatospora acuminata</i> Ingold	Asturias	Unknown
FP 48	<i>Anguillospora crassa</i> Ingold	Avila	<i>Mollisia uda</i> (Pers.: Fr.) Gill. (Leotiales)
FP 154	<i>Anguillospora crassa</i> Ingold	Segovia	<i>Mollisia uda</i> (Pers.: Fr.) Gill. (Leotiales)
FP 216	<i>Anguillospora crassa</i> Ingold	Avila	<i>Mollisia uda</i> (Pers.: Fr.) Gill. (Leotiales)
ED 61	<i>Anguillospora</i> sp.	Mallorca	
FP 129	<i>Articulospora tetracladia</i> Ingold	Segovia	<i>Ombrophila tetracladia</i> (Abdullah <i>et al.</i>) Baral & Kriegerstein (Leotiales)
ED 67	<i>Dendrospora tenella</i> Descals & Webster	Avila	Unknown
ED 64	<i>Filosporella</i> sp.	Leon	Unknown
FP 168	<i>Flagellospora</i> sp.	Segovia	Unknown
FP 225	<i>Gyosphyella</i> sp.	Madrid	Unknown
FP 204	<i>Heliscella stielata</i> (Ingold & Cox) Marvanová	Avila	Unknown
FP 138	<i>Heliscus lugdunensis</i> Saccardo. & Therry	Segovia	<i>Nectria lugdunensis</i> Webster (Hypocreales)
FP 373	<i>Heliscus lugdunensis</i> Saccardo. & Therry	Asturias	<i>Nectria lugdunensis</i> Webster (Hypocreales)
FP 273	<i>Margaritispora aquatica</i> Ingold	Avila	Unknown
FP 159	<i>Tetrachaetium elegans</i> Ingold	Segovia	Unknown
FP 199	<i>Tetracladium seigerum</i> (Grove) Ingold	Avila	Unknown
ED 21	<i>Tricladium curvisporum</i> Descals	Leon	Unknown
ED 45	<i>Tricladium splendens</i> Ingold	Leon	<i>Hymenoscyphus splendens</i> Abdullah <i>et al.</i> (Leotiales)
FP 27	<i>Tricladium splendens</i> Ingold	Avila	<i>Hymenoscyphus splendens</i> Abdullah <i>et al.</i> (Leotiales)
ED 31	<i>Tumulata aquatica</i> (Ingold) Descals & Marvanová	Leon	<i>Massarina aquatica</i> Webster (Dothideales)
FP 148	<i>Tumulata aquatica</i> (Ingold) Descals & Marvanová	Segovia	<i>Massarina aquatica</i> Webster (Dothideales)
ED 60	<i>Tumulata tuberculata</i> (Gonzol.) Descals & Marvanová	Mallorca	Unknown
FP 2	<i>Varicosporium eideae</i> Kegel	Avila	Unknown
FP 164	<i>Varicosporium etodeae</i> Kegel	Segovia	Unknown
FP 384	Hyphomycete undetermined	Asturias	Unknown

Cultural conditions :

Plugs of actively growing fungal mycelia, grown on potato dextrose agar (Difco) (0.5 mm²), were placed on the surface of 9 cm diameter Petri dishes containing 20 ml of medium composed by 1% nutrient and 2% agar. Duplicates of these plates were incubated for 2 and 4 weeks respectively at 22°C. The complex nutrient sources tested were : yellow corn meal (Quaker), corn steep liquor (Roquette), pharmedia (Traders Protein), malt extract, casein hydrolysate, peptonized milk (Oxoid), molasses (Riverton), soy meal, carboxymethylcellulose (Sigma), tomato paste (HUNBS), yeast extract, tryptone, bacto-peptone, beef extract, brain heart infusion, casamino acids, skim milk, potato dextrose broth (Difco), amycase, ardamine, N-Z-Amine E, Hy-Soy (Sheffield), soluble starch (USB) and oat meal (Santiverly).

Antimicrobial activity assays :

Antibacterial assay. The antibacterial assay Petri dishes were prepared with 10 ml of melted nutrient agar (Difco) inoculated with *Bacillus subtilis* (0.5 ml of a spore suspension (Difco) per 1 liter of melted nutrient agar (Difco) cooled at 45°C)

Antifungal assay : The antifungal Petri dishes were prepared with 10 ml of melted YNB-D medium (dextrose 1%, yeast nitrogen base (Difco) 0.7% and agar 1.5%), cooled at 45°C and inoculated with a titrated spore suspension of *Aspergillus fumigatus* Fres. ATCC 13073. The final concentration of spores was 5×10^5 spores/liter.

To perform the antimicrobial tests, 8 mm diameter agar plugs were cut from plates with hyphomycetes after 2 and 4 weeks of incubation, and placed over the surface of the assay plates, and were incubated overnight at 37°C. The diameter of the inhibition zone around each agar plugs was recorded.

RESULTS

Fifteen strains, belonging to 11 fungal species, produced antibacterial activity under at least, one cultivation condition (Table 2). The production of antifungal activities was not as frequent, being observed in 8 strains belonging to 6 fungal species (Table 3). Both antibacterial and antifungal activities were detected with 5 strains : *Dendrospora tenella*, *Gyoerffyella* sp., *Tumularia aquatica* ED 31 and FP 148 and *Varicosporium elodeae* FP 2. In one case, *Gyoerffyella* sp., the inhibition of both target strains was detected under the same cultural conditions, suggesting the presence of a single activity with both antibacterial and antifungal properties, or a common stimulation of the production of several agents. The tested strains of *A. acuminata*, *A. tetracladia*, *Fillosporella* sp., *H. stellata*, *T. curvisporum* and *T. splendens*, did not produce antimicrobial activities in the conditions studied.

The data suggest that both types of antimicrobial activities are released at different incubation times; 77% of the 63 antifungal activities were detected at 2 weeks, being 35 activities detected both at 2 and 4 weeks. However, only 48% of the 82 antibacterial activities detected were shown at 2 weeks, being 30 of them also observed at 4 weeks. Assuming that the detection of these antimicrobial activities at 2 time periods is due to the

Table 2. Presence of inhibition zones against *B. subtilis* produced by hyphomycete strains

Source	<i>Dendrospora</i> <i>tenella</i> ED 67	<i>Flagellospora</i> sp. FP 168	<i>Cyverffivella</i> sp. FP 225	<i>Vancosporium</i> <i>elodae</i> FP 2	<i>Anguillospora</i> <i>crassa</i> FP 216	<i>Anguillospora</i> sp. ED 61	<i>Tetrachaetium</i> <i>elegans</i> FP 159	<i>Tetractidium</i> <i>setigerum</i> FP 199	<i>Vancosporium</i> <i>elodae</i> FP 164
soy meal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
oat meal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corn meal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tomato paste	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potato dextrose	+-	-	-	+-	-	-	-	-	-
malt extract	++	-+	++	-+	-	-	-	-	-
molasses	++	-+	++	++	-	-	-	-	-
soluble starch	++	-+	++	-+	-	-	-	-	-
carboxymethylcellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pharmamedia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corn steep liquor	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy-soy	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ardamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-
yeast extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-
brain heart infusion	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bactopeptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-
beef extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-
skim milk	-	-	-	-	-	-	-	-	-
peptonized milk	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Z-amine E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
casein hydrolysate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
amylase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
casamino acids	-	-	-	-	-	-	-	-	-
tryptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+-, Activity detected only at 2 wk.
 -+, Activity detected only at 4 wk.
 ++, Activity detected at 2 and 4 wk.
 -, No activity

Table 2. Continued

Source	<i>Anguillospora crassa</i>		<i>Anguillospora crassa</i>		<i>Margaritispora aquatica</i>		<i>Tumularia aquatica</i>		<i>Tumularia aquatica</i>		<i>Tumularia tuberculata</i>	
	FP 48	FP 154	FP 154	FP 273	ED 31	FP 148	ED 60					
soy meal	-	-	-	-	++	++	-	++	++	-	++	++
cat meal	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
corn meal	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
tomato paste	-	+-	+-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
potato dextrose	+-	++	++	+-	++	-	-	++	-	-	++	++
malt extract	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
molasses	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
soluble starch	-	+-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
carboxymethylcellulose	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
pharmamedia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corn steep liquor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy-soy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ardamine	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
yeast extract	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
brain heart infusion	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
bactopeptone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
beef extract	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
skim milk	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
peptonized milk	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
N-Z-amine E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
casein hydrolysate	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
amylase	-	-	-	-	+-	-	-	+-	-	-	+-	+-
casamino acids	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++
tryptone	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++

+-, Activity detected only at 2 wk.

-+, Activity detected only at 4 wk.

++, Activity detected at 2 and 4 wk.

-, No activity

Table 3. Presence of inhibition zones against *A. fumigatus* produced by hyphomycete strains.

Source	<i>Dendrospora</i>	<i>Civoriiflyella</i>	<i>Varicosporium</i>	<i>Heliscus</i>	<i>Heliscus</i>	<i>Heliscus</i>	<i>Hyphomycete</i>	<i>Tumularia</i>	<i>Tumularia</i>
	<i>tenella</i> ED 67	sp. FP 225	<i>elodeae</i> FP 2	<i>lugdunensis</i> FP 138	<i>lugdunensis</i> FP 373	<i>lugdunensis</i> FP 373	— FP 384	<i>aquatica</i> ED 31	<i>aquatica</i> FP 148
soy meal	-	-	-	-	-	-	-	++	++
oat meal	-	-	-	-	-	-	-	+	-
corn meal	-	-	-	-	-	-	-	+	-
tomato paste	-	-	-	+	-	-	-	++	++
potato dextrose	-	-	+	++	++	-	-	-	-
malt extract	++	++	++	-	-	-	-	-	+
molasses	++	++	++	+	-	-	-	+	+
soluble starch	-	+	-	-	-	-	-	-	-
carboxymethylcellulose	-	-	-	+	-	-	-	-	-
pharmamedia	-	-	-	-	-	-	-	-	-
corn steep liquor	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hy-soy	-	-	-	+	-	-	-	++	+
ardamine	-	-	-	++	++	-	-	-	-
yeast extract	-	-	-	++	++	-	-	-	+
brain heart infusion	-	-	-	++	++	-	-	-	-
bactopeptone	-	-	-	++	+	-	+	++	-
beef extract	-	-	-	+	-	-	-	-	-
skim milk	-	-	-	-	++	++	-	+	+
peptonized milk	-	-	-	++	+	-	-	++	+
N-Z-amine E	-	-	-	++	-	-	-	++	++
casein hydrolysate	-	-	-	+	-	-	-	++	+
amylase	-	-	-	++	+	-	++	++	+
casamino acids	-	-	-	-	-	-	-	++	++
tryptone	-	-	-	++	-	-	-	++	++

+-, Activity detected only at 2 wk.
 -+, Activity detected only at 4 wk.
 ++, Activity detected at 2 and 4 wk.
 -, No activity

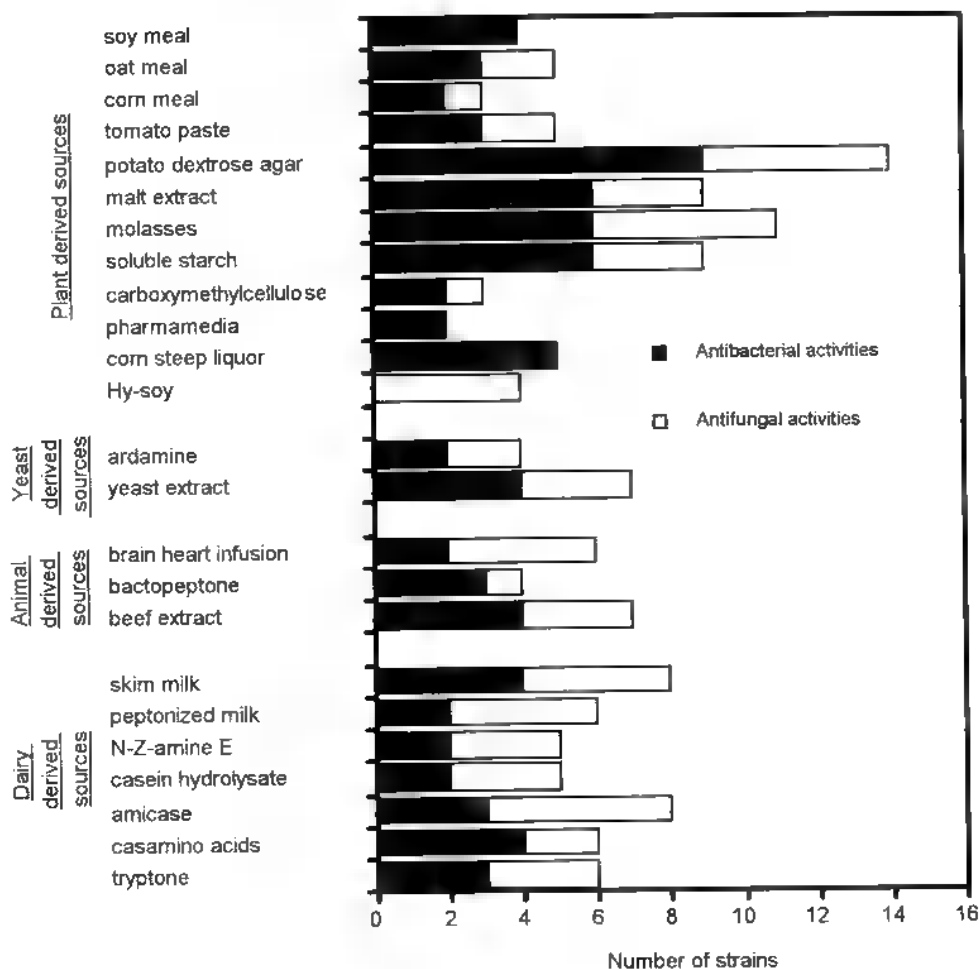


Figure 1. — Number of hyphomycete strains having antimicrobial activities when cultured in a single nutrient.

action of the same active agent(s), this result could suggest either that the antimicrobial compounds produced were relatively stable, or that they were being continuously synthesized along the whole course of the incubation.

Although the production of antimicrobial activities in all the hyphomycetes tested is not induced by a given complex source, some of them, such as potato dextrose, malt extract and soluble starch, were especially useful (Fig. 1). These media share a low nitrogen/carbon ratio, characteristic of traditional fungal media. Nevertheless, other nutrient sources with a higher nitrogen/carbon balance such as beef extract or skim milk also supported the production of biological activities in a considerable number of strains.

The conditions and ability for the production of antimicrobial activities varied among strains of the same species. For example, in the three strains of *A. crassa*, the number of sources that stimulate the production of the antibacterial activity in FP 48, FP 154 and FP 216 were 6, 12 and 1, respectively.

The production of antimicrobial agents in response to the different media by the aquatic hyphomycetes studied, was very variable. For instance, *T. setigerum* and *T. elegans* produced antibacterial activities only under one condition. *Dendrospora tenella*, *Flagellospora* sp., *Gyoserffyyella* sp. and *V. elodeae* FP 2 produced these activities in carbohydrate enriched media such as malt extract, molasses and soluble starch. Finally, some fungi such as *H. lugdunensis* or species of the genus *Tumularia* produced antimicrobial activity when grown in several sources with no related ingredients.

DISCUSSION

The production of diffusible antibiotic substances is a widely distributed characteristic among fungi. Although it is difficult to infer the role of these compounds in natural environments or if they occur at all, they could provide an ecological advantage in the immediate micro habitats of the producer organisms by defending its nutritional or positional resources from other competitors. Theoretically, this statement may be less applicable to aquatic environments, because of the ecological ineffectiveness of a compound that is constantly removed by water. Therefore, although aquatic hyphomycetes most likely persist in twigs and leaves that are exposed to terrestrial environments, the ecological preeminence of a fungus able to produce antibiotics in aquatic systems is not so obvious. In any case, the ability of several aquatic hyphomycetes to produce these compounds has been shown previously (Shearer & Zare-Maivan, 1988; Fisher & Anson, 1983), and has been also extensively observed in this work.

The substrates inhabited by this group of fungi, deciduous leaves and submerged woods, due to their lignin enriched composition are hypothetically more susceptible to fungal rather than to bacterial colonization. For that reason, as the major competitors of these organisms in nature should be other fungi, aquatic hyphomycetes would be expected to produce a fungal rather than a bacterial inhibition. However, in the survey presented in this work, from 19 fungal species tested, 11 appear to produce bacterial inhibition and only 6 produce antifungal compounds. Although the extrapolation of these observations to the real interactions of these fungi in natural environments could be undoubtedly questioned, these data may suggest the importance of bacterial-fungal interactions in the colonized wood habitat. The release of an antibacterial agent could limit the consumption by bacteria of the sugars and other nutrients liberated by the extracellular enzymatic machinery of the fungi (cellulases, xylanases, pectinases, etc.).

Antifungal agents not only interfere with the growth of other hyphomycetes but also affect the viability of yeasts. Yeasts, like bacteria, are commonly found in freshwater courses, have high growth rates, and could behave as opportunistic commensals of the substances liberated by them. It has been reported that wood blocks colonized by *Tumularia aquatica* (syn. *Massarina aquatica*) were able to inhibit the growth of the yeast *Sporobolomyces roseus* (Fisher & Anson, 1983). The 2 different strains of *Tumularia aquatica* studied in this work also produced an antifungal activity that caused the inhibition of *Candida albicans* (data not shown), together with an antibacterial agent, whose production did not always coincide with the detection of the antifungal activity.

Heliscus lugdunensis, a species from submerged twigs and leaves, produced an antifungal activity. Shearer & Zare-Maivan (1988), studying the *in vitro* interactions among different fungi from freshwater habitats, have suggested that this species might not be able to inhibit growth of invading species or to defend captured resources. We observed antifungal activities in the two *H. lugdunensis* strains studied, FP 138 and FP 373. These data do not agree with the above mentioned suggestion, perhaps because their competition experiments were performed on corn meal agar, medium in which we were also unable to detect the antifungal activity produced by this organism (Table 3). Also, it has to be considered that the production of the antifungal agent shows strain-to-strain variations, as evidenced by the fact that from the sixteen cases in which an antifungal activity appeared, only 8 were common between both isolates. The potentially different susceptibility of *A. fumigatus* and the aquatic hyphomycetes studied by Shearer & Zare-Maivan to the antifungal compound, could also contribute to explain the different results.

As mentioned above, 5 strains inhibited both target organisms. However, the number of these antimicrobial activities could be higher, because the detection of an antimicrobial activity is related to the concentration tested and, also, to the susceptibility of the target strain to the active agent(s). As an example, anguillosporal from *Anguillospora longissima* (Sacc. & Syd.) Ingold (Harrigan *et al.*, 1995) is able to inhibit both bacteria and fungi, with MIC values of 4 µg/ml against *Staphylococcus aureus* and 58 µg/ml against *Candida albicans*. The ecological impact of a broad spectrum antibiotics in natural conditions is unknown. However, in terms of metabolic economy, it may be considered that the synthesis of a general inhibitor could be less expensive than the production of several specific compounds.

This work has also shown the heterogenous behavior of this group of fungi with regards to the conditions required for antibiotic production. Based on this aspect, the hyphomycetes studied could be divided in four groups: i) fungi producing the antimicrobial activity selectively in media with a very low nitrogen/carbon balance (malt extract, molasses, soluble starch or potato dextrose), such as *D. tenella*, *Gyoerffyyella* sp., *V. elodeae* FP 2, and *Flugeliospora* sp.; ii) fungi that produce the antimicrobial activity only in media with a high nitrogen/carbon balance. (*A. crassa* FP 216, ED 61 and Hyphomycete 1); iii) fungi whose antimicrobial activity production is less dependent of the nitrogen/carbon balance like, *H. lugdunensis*, *T. aquatica*, *T. tuberculata*, *A. crassa* FP 48, FP 154 and *M. aquatica*; iv) finally those fungi that produce their antimicrobial activities specifically in plant derivatives such as pharmamedia or corn steep liquor, (*T. setigerum*, *T. elegans* and *V. elodeae* FP 164). The observation of these activities in these non-overlapping circumstances could be related to the presence of specific precursors of the active substance(s) in these media, as it was reported for the synthesis of penicillin G by *Penicillium chrysogenum* (Mead & Stack, 1948).

The production of the antimicrobial activity was neither associated with the growth level of the fungi on each specific substrate, nor with the ability to synthesize degrading enzymes such as cellulases or proteases (data not shown). However, these optimum conditions for antibiotic production could be hypothetically related to the degree of specificity of fungi for colonizing a given substrate, or for determining their role during the ecological succession of fungi in the decomposition of the plant substrates.

This work has shown that aquatic hyphomycetes are a potential source of uncharacterized bioactive compounds. To obtain a maximum information on the metabolic potential of these fungi, several media with different nitrogen/carbon balance should be applied, rather than different media with a low nitrogen/carbon balance, as it has been traditionally used (Poch & Gloer, 1992; Harrigan *et al.*, 1995). Other physical variables not

considered in this work, such as temperature or pH, might also influence the production of these still uncharacterized compounds.

REFERENCES

- FISHER J. P. & ANSON A. E., 1983 — Antifungal effects of *Massarina aquatica* growing on oak wood. *Transactions of the british mycological society* 81 : 523-527.
- HARRIGAN G. G., ARMENTROUT B. L., GLOER J. B. & SHEARER C. A., 1995 — Anguillosporal, a new antibacterial and antifungal metabolite from the freshwater fungus *Anguillospora longissima*. *Journal of natural products* 58 : 1467-1469.
- MEAD T. H. & STACK M. V., 1948 — Penicillin precursors in corn steep liquor. *Biochemical journal*, 42 : Proc. xviii.
- POCH G. K. & GLOER J. B., 1989a — Helicascolides A and B: New lactones from the marine fungus *Helicascus kanaloanus*. *Journal of natural products* 52 : 257-260.
- POCH G. K. & GLOER J. B., 1989b — Obionin A: a new polyketide metabolite from the marine fungus *Leptosphaeria obiones*. *Tetrahedron letters* 30 : 3483-3486.
- POCH G. K., GLOER J. B. & SHEARER C. A., 1992 — New bioactive metabolites from a freshwater isolate of the fungus *Kirschsteiniothelia* sp. *Journal of natural products*, 55 : 1093-1099.
- SHEARER C. A. & ZARE-MAIVAN H., 1988 — In vitro hyphal interactions among wood and leaf inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti from freshwater habitats. *Mycologia* 80 : 31-37.
- SHIN J. & PENICAL W., 1987 — Isolation of gliovicin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. *Phytochemistry* 26 : 3374.
- SUGANO M., SATO A., IJIMA V., OSHIMA T., FURUYA K., KUWANO H., HATA T. & HANZAWA H., 1991 — Phomactin A: a novel PAF antagonist from a marine fungus *Phoma* sp. *Journal of the american chemical society* 113 : 5463-5464.
- SUBERKROPP K., 1992 — *Aquatic hyphomycete communities*. In : Carrol G.C. & Wicklow D. I. (eds), *The Fungal Community*. second edition. Marcel Dekker, Inc. New York, New York. pp 729-747.
- TAKAHASHI C., TAKAI Y., KIMURA Y., NUMATA A., SHIGEMATSU N. & TANAKA H., 1995a — Cytotoxic metabolites from a fungal adherent of a marine alga. *Phytochemistry* 38 : 155-158.
- TAKAHASHI C., MINOURA K., YAMADA T., NUMATA A., KUSHIDA K., SHINGU T., HAGISHITA S., NAKAI H., SATO T. & HARADA H., 1995b — Potent cytotoxic metabolites from *Leptosphaeria* species. Structure, determination. *Tetrahedron* 51 : 3483-3494.
- YU C. M., CURTIS J. M., WALTER J. A., WRIGHT J. L. C., AYER S. W., KALETA J., QUERENGESSER L. & FATHI-AFSHAR Z. R., 1996 — Potent inhibitors of cysteine proteases from the marine fungus *Microascus longirostris*. *Journal of antibiotics*, 49 : 395-397.

SUR LES RELATIONS ENTRE UN BASIDIOMYCÈTE DE ROND DE SORCIÈRE, *LEUCOPAXILLUS GIGANTEUS*, LA MICROFLORE DU SOL ET LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS.

Paul KAISER *

INA-PG
Microbiologie
78850 THIVERVAL-GRIGNON
FRANCE

* adresse actuelle : 12 bis rue de Porto-Riche 92190 MEUDON

ABSTRACT : *Leucopaxillus giganteus* developed as fairy rings in an acid grassland. According to the climatic conditions the spreading of the fairy ring ranged from 25 to 60 cm each year and occurred at the end of the winter and the early spring. Fructification occurred between september and october. Mycelium grew around the stolons and the roots of the grassland plants which were destroyed. The pH of the invaded soil raised due to a high ammonia level but the content of organic carbon and the C/N ratio was lowered. The *Leucopaxillus* mycelium enhanced the mineralization of organic carbon and nitrogen, the decomposed organic matter was partially humified. Concerning enzymatic activities of the invaded soil a decrease of the urease and an enhancement of the desaminases and pectinases activities was noticed. Supplementation in glucose or reducing sugars from root exudates specifically stimulated the oxygen uptake of the invaded soil. In the latter the moulds were in great part eliminated but the number of the other soil microorganisms was only weakly affected. *In vitro* the *Leucopaxillus* mycelium inhibited the growth of bacteria and actinomycetes but not the moulds. Mycelium growth of *Leucopaxillus* on sterile and non sterile soil showed that the microflora exerted a strong inhibitory action against the *Leucopaxillus*. The inhibition diminished at low temperature. In pure culture *Leucopaxillus* mycelium developed well at +4° C whereas the major part of moulds and bacteria did not. It appeared that the *Leucopaxillus* needed two conditions for growth in soil : A biological void and an adapted nutrient. Low temperatures of the winter create the biological void. Root exudates and bacterial polysaccharides of the roots could be the nutrient. *In vitro* the *Leucopaxillus* developed on bacterial mats but not on mould mats. It used well semi-synthetic media for growth. Best nitrogen sources were peptones, numerous simple sugars and polysaccharides could be used.

KEY WORDS : *Leucopaxillus giganteus*, soil biochemistry and microbiology, Phanerogams.

RÉSUMÉ : *Leucopaxillus giganteus* se développe en cercles dans une prairie acide où il avance de 20-60 cm chaque année. il croît autour des racines des phanérogames qui sont détruits et augmente la minéralisation du carbone et de l'azote organique. Les moisissures du sol sont, en grande partie, éliminées alors qu'*in vitro*, ce sont les bactéries et les actinomycètes qui sont inhibés. La microflore du sol exerce une action inhibitrice sur le développement du *Leucopaxillus* et celui-ci ne peut se propager qu'à la fin de l'hiver quand il y a un vide biologique. Le basidiomycète se multiplie bien au laboratoire sur des milieux peptonés semi-synthétiques et utilise une grande variété de glucides.

MOTS CLEFS : *Leucopaxillus giganteus*, biochimie et microbiologie du sol. Phanérogames.

INTRODUCTION

Il n'existe pas un mycologue qui n'ait observé, ici ou là, la forme annulaire qu'affectent quantité de mycéliums de champignons supérieurs, les uns dans les prés, visibles de tout temps à cause de l'herbe plus verte ou morte qui les dessine et, ceux des forêts, décelables au moment de la production de sporophores (Becker, 1990). Pour Fenwick (1976), les cercles peuvent être causés par 50 espèces de champignons. Très tôt, les mycologues se sont intéressés à la physiologie de ces anneaux (« ronds de sorcières »). Molliard (1910, 1925) mesurait l'accumulation d'ammoniaque dans la zone de croissance de *Marasmius oreades* (Bolt. : Fr.) Fr. et indiquait son rôle phytotoxique.

Hollande (1945) étudie la clitocybine, antibiotique excrété par *Leucopaxillus giganteus* (Leysser : Fr.) Singer (*Clitocybe maxima*) et constate que ce champignon détermine, dans les prairies alpines de 900 à 1400 mètres, la formation d'anneaux dont l'herbe est morte et peu putrescible. Il pense que le champignon, en se développant, tue l'herbe et doit élaborer un principe actif inhibant la multiplication des microbes nécessaires à la putréfaction des végétaux.

Couderchet (1967) reprend le travail sur un anneau dû à *Lepista personata* (Fr. : Fr.) W. Smith et constate une accumulation d'ammoniaque dans la zone dénudée, une élimination des moisissures et une inhibition des bactéries nitrifiantes.

Norstadt *et al.* (1973) notent la pauvreté de l'activité uréase d'un sol infesté de *Marasmius oreades*. Ces résultats prouvent que la multiplication d'un champignon supérieur provoque des changements physico-chimiques du sol, entraînant des variations importantes de la croissance herbacée et microbienne.

D'autre part, comme l'a montré Gramss (1981, 1985), les Basidiomycètes subissent, de la part du sol, un fort antagonisme.

Nous avons repris ces recherches sur deux anneaux dûs à *Leucopaxillus giganteus* situés dans une prairie acide de Jouy en Josas aux Metz (Yvelines) en analysant, d'une part l'effet du Basidiomycète sur l'évolution physico-chimique et microbiologique du sol infesté et, d'autre part, l'impact de la microflore autochtone sur sa croissance.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Dénombrement des groupes microbiens du sol : Pochon & Tardieux (1962).

— Analyses physico-chimiques :

pH : 5 g de sol + 5 g d'eau distillée ; mélange et mesure au pH-mètre.

C, N : Doseur automatique Hewlett-Packard

NH₄⁺ : méthode colorimétrique de Hoffmann & Teicher (1961).

NO₃ — : méthode à l'acide chromotropique selon Sims & Jackson (1971).

Humidité : balance à humidité

Acides humiques : selon Pochon & Tardieux (1962).

HCN : papiers filtres imprégnés d'une solution contenant du carbonate de soude à 2,5 % et de l'acide picrique à 0,5 % (réactif de Guignard *in* Lebeau & Hawn (1963).

— Enzymes :

Uréase, Désaminases : méthode de Hoffmann & Teicher (1961).

Phosphatase : méthode de Hoffman (1967).

Pectinases : méthode de Kaiser & Monzon (1972).

— Respiration :

CO₂ *in situ* : méthode de Bachelier (1973).

Absorption de l'oxygène : Appareil de Warburg selon Umbreit *et al.* (1964).

— Antagonisme de la terre : technique de Pink (1961)

— Activité antagoniste : *Leucopaxillus giganteus* est cultivé sur boîtes de gélose malt-peptone (extrait de malt : 10 g/l ; bacto-peptone Difco : 2 g/l). Des carrés de mycélium de 1 cm de côté sont découpés et placés sur des géloses asparagine-glucose (Pochon & Tardieux, 1962) préalablement ensemencées avec des souches pures ou des suspensions-dilutions de terre.

— Culture de *Leucopaxillus giganteus* :

Milieu semi synthétique : eau déminéralisée 1 l ; phosphate monopotassique 1 g ; sulfate de magnésium 0,5 g ; chlorure de calcium 0,1 g ; chlorure de sodium 0,1 g ; solution d'oligoéléments 5 ml ; solution de vitamines 0,5 ml ; bacto-peptone (Difco) 5 g ; pH 6,0. Les glucides sont ajoutés à raison de 2 g/l.

Solution d'oligoéléments (en g/l) : éthylènediaminétriacétate sel disodique 1,7 ; sulfate de fer ferreux 1,0 ; sulfate de manganèse 0,3 ; acide borique 0,1 ; sulfate de zinc 0,05 ; sulfate de cuivre 0,05 ; molybdate d'ammonium 0,05 ; nitrate de cobalt 0,05 ; sulfate de cadmium 0,05

Solution de vitamines (en mg/100ml) : B12 2 ; thiamine 100 ; biotine 2 ; panto-thénate de calcium 2.

— Milieu pour plantules (en mg/l) : nitrate de calcium 750 ; nitrate de potassium 450 ; sulfate de magnésium 260 ; phosphate monopotassique 136 ; solution d'oligoéléments (ci-dessus) 10 ml.

— Préparation des sucres réducteurs provenant de la rhizosphère des plantes de prairies : Les racines et le sol rhizosphérique attenant sont lavés dans un mélange éthanol-eau (30 : 70).

Le liquide de lavage est clarifié par centrifugation puis concentré. Il est alors passé sur résine cationique, puis sur résine anionique. Le liquide résiduel contenant les sucres est concentré à sec puis repris par 2 ml d'eau distillée. Les sucres réducteurs sont dosés par la méthode de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Description de la prairie

Il s'agit d'une prairie à sol acide, (voir tableau 1 pour les données physico-chimiques) régulièrement tondue et comportant de nombreux types de plantes herbacées.



Fig. 1 - « Rond de sorcière » à *Leucopaxillus giganteus* dans une prairie acide de Jouy en Josas (78) au mois de septembre.

Nous y avons déterminé : *Festuca rubra*, *Holcus lanatus*, *Agrostis vulgaris* et *A. stolonifera*, *Anthoxanthum odoratum* pour les Graminées ; *Lotus corniculatus*, *Orobus tuberosus*, *Trifolium spp.* pour les Légumineuses ; *Hieracium pilosella*, *Achillea millefolium*, *Centaurea jacea*, *Chrysanthemum segetum*, *Picris hieracioides* pour les Composées ; *Plantago lanceolata*, *Carex glauca*, *Luzula campestris*, *Calluna vulgaris*, *Brunella vulgaris* pour ne nommer que les principales espèces d'autres familles.

Croissance *in situ* de *Leucopaxillus giganteus*

Dans le sol, le nouveau mycélium apparaît début mars, à la fin de l'hiver. Soit il est déjà visible macroscopiquement au niveau des stolons et des radicelles, soit le sol autour des racines se décolore, ce qui annonce son apparition massive. A cette époque, les plantes ne sont pas encore détruites. Le mycélium croît à 5-10 cm de la zone de développement de l'année précédente, laissant intacte une bande de prairie entre l'ancienne et la nouvelle zone. Nous n'avons pu trouver de mycélium reliant ces deux zones. Au cours du mois d'avril, le dépérissement des plantes de prairies envahies par le mycélium se manifeste sous forme de plaques jaunes, irrégulières et discontinues, disposées en une ligne presque droite ou un léger arc de cercle dont il est difficile d'évaluer le diamètre. Les plaques de pelouse détruite ont une largeur de 15 à 30 cm, parfois 50 cm lorsque le printemps est froid et humide et une longueur comprise entre 15 et 100 cm (figure 1).



Fig. 2 — Profil du terrain au niveau de la couronne mycélienne en avril. A gauche, terre témoin ; à droite, terre envahie par le mycélium du *Leucopaxillus giganteus*. Les stolons et radicelles des plantes sont enrobés de mycélium, la terre est décolorée.

En mai, les plantes envahies meurent et on remarque que le mycélium a poussé dans la zone des stolons et des radicelles sur quelques cms de profondeur (figure 2).

La terre envahie est décolorée par rapport à la terre non colonisée. Les stolons et racines des plantes sont complètement pourris. L'écorce est digérée, brune ; il ne subsiste qu'un cylindre central. Stolons et racines ont été pratiquement asphyxiés par l'important développement du mycélium qui les recouvre d'un dense feutrage blanc. C'est seulement plus tard, dans le courant du printemps, que le mycélium colonise les couches profondes (15 cm) du sol. La production de sporophores a lieu en septembre ou octobre. Les sporophores se situent alors à la périphérie des zones dénudées (figure 1) ; l'année suivante, elles seront recolonisées ; d'abord, par les plantes traçantes en surface : *Hieracium pilosella*, *Achillea millefolium* puis, progressivement, par des plantes à racines plus profondes. Le mycélium disparaît petit à petit des zones qu'il a colonisées et la végétation devient luxuriante.

Notre champignon fait chaque année une avancée centrifuge comprise entre 25 et 60 cm. Couderchet (1967) note une avancée moyenne annuelle de 50 cm en 12 ans avec *Lepista personata* mais la distance entre la 11^e et 12^e année est de 130 cm. Pour *Agaricus arvensis* J. C. Sch. : Fr., Edwards (1984) donne une moyenne de 42 à 49 cm par an. Ces trois espèces présentent une progression comparable et irrégulière d'une année à l'autre. Dans le cas de *Lepista personata*, Couderchet (1967) a nettement observé la prolifération cen-

	<i>Leucopaxillus</i>		Témoïn	
	72	73	72	73
pH	5,1	5,0	4,5	4,4
C%	4,2	4,8	5,2	5,5
N%	0,15	0,45	0,08	0,33
C/N	28	10,6	65	16,6
ac. humiques g/Kg	10,5	-	7,8	-
N-NO ₃ mg/100g	1,6	-	0,5	-
N-NH ₄ mg/100g	42	30	1,4	4

Tableau 1 — Analyses physico-chimiques de la terre à *Leucopaxillus giganteus* et de la terre témoin en novembre 1972 et 1973.

trifuge du mycélium à la surface de la terre, reliant ainsi l'ancien cercle au nouveau. Nous n'avons jamais pu relever un tel phénomène : avec *Leucopaxillus*, aucun mycélium n'apparaît entre l'ancien et le nouveau cercle, que ce soit en profondeur ou en surface. Il est donc possible que ce champignon progresse grâce à ses spores. Toohey (1983), qui a observé 31 espèces de champignons de ronds de sorcière, pense que les spores sont responsables de la formation de nouvelles colonies. Cependant, une fois en janvier, nous avons décelé, à un endroit situé en bordure de l'ancien cercle, un développement de mycélium juste au niveau des stolons et des racines. Shantz et Piemeisel (1917) ont reconnu trois types d'anneaux selon leur action sur les Phanérogames. Le type 1, auquel appartient *Leucopaxillus*, comprend les mycéliums tuant ou endommageant sérieusement la végétation. *Leucopaxillus* a une affinité particulière pour les racines et les stolons qu'il colonise en premier. On peut sûrement le classer comme un pathogène des plantes de prairies. Gramss (1981) constate la dépendance de quelques Basidiomycètes vis-à-vis des racines des plantes cultivées et Poppe (1970/1971) (*in* Gramss, 1981) suggère que les racines vivantes des végétaux de prairie constituent une niche écologique pour le développement du mycélium des espèces d'*Agaricus*. Smith (1980) considère *Marasmius oreades* comme un parasite des racines.

Analyse physico-chimique de la terre des ■■■■■

La zone externe (T) non envahie a été comparée à l'anneau envahi par le mycélium de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) (analyses effectuées en novembre, tableau 1).

Nous mesurons dans la zone Lg une élévation du pH, due à une forte augmentation du taux d'azote ammoniacal. Aussi, le taux d'azote total dans Lg est-il plus élevé et le rapport C/N plus bas. Dans la zone à mycélium, il y a un peu moins de carbone organique mais davantage d'acides humiques. La minéralisation accentuée du carbone et de l'azote dans la zone à Lg va de pair avec une humification accentuée de la matière organique décomposée. Grunda (1976) a noté, pour d'autres Basidiomycètes, une élévation du taux des acides humiques. Ces résultats démontrent aussi que la décoloration de la terre par *Leucopaxillus* n'est pas le résultat d'une élimination des acides humiques. Elle dépendrait de l'excrétion d'acides organiques par *Leucopaxillus*. Nous avons vérifié que l'acide citrique décolore les acides humiques et que *Leucopaxillus* excrète des acide

	LG	T
Uréase ($\mu\text{gN-NH}_4/\text{g terre/heure}$)	33	77
désaminase ($\mu\text{gN-NH}_4/\text{g terre/heure}$)		
Aspartate	0	0,04
Proline	2,1	0,4
Glycine	0,4	1,2
Glutamate	1,6	0,3
Leucine	1,9	0,4
Alanine	3,1	1
Arginine	2,6	1
Ornithine	1,7	0,5
Phosphatase acide ($\mu\text{g phénol/g terre/heure}$)	30	28
Pectinelyase ($\mu\text{g sucres réducteurs/g/heure}$)		
novembre	52	76
mai	120	82

Tableau 2 — Activité enzymatique des sols à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et témoin (T) en novembre 1972.

organiques dans les milieux de culture au laboratoire : les milieux sont fortement acidifiés après la culture. Plusieurs auteurs dont Edwards (1984) et Couderchet (1967) mentionnent une décoloration de la terre envahie par le mycélium des Basidiomycètes. Dès 1910, Molliard relate une forte augmentation de l'ammoniaque dans les zones à mycélium de *Marasmius*, fait confirmé par Couderchet (1967) pour le *Lepista*. Cet auteur note aussi une augmentation de l'azote nitrique, ce que nous avons également observé. La diminution de la matière organique a été établie par Edwards (1984) sur des anneaux à *Agaricus* et confirme nos données. Grunda (1976), en comparant le sol témoin avec des sols envahis par trois types de Basidiomycètes, constate un abaissement du pH et du taux de calcium, une élévation du taux de N, P, K solubles alors que Fisher (1977) montre une diminution de N et P extractibles dans les sols où *Marasmius oreades* est passé. On peut donc conclure que le développement massif des mycéliums de Basidiomycètes stimule fortement la minéralisation du carbone et de l'azote organiques du sol. Dans notre cas, une partie de la matière organique décomposée est humifiée.

Nous avons dosé l'activité de quelques enzymes (tableau 2). La terre à Lg contient moins d'uréase, ce qu'ont déjà constaté Norstadt *et al.* (1973) pour les anneaux à *Marasmius oreades*. L'urée ne semble pas constituer un bon substrat azoté pour ces champignons. Par contre, la terre à Lg est plus riche en désaminases diverses, excepté pour la glycine-désaminase. Les acides aminés constituent donc de bonnes sources d'azote pour Lg et sont facilement minéralisés, d'où le taux élevé en ammoniaque retrouvé dans les anneaux.

Les enzymes pectinolytiques (pectinelyase) ainsi que la phosphatase acide reflètent l'activité biologique globale (Kaiser & Monzon de Asconegui, 1972 ; Domsch *et al.*, 1979). Elles ont une activité sensiblement égale pour les terres à Lg et le témoin. On remarque cependant une activité plus forte pour Lg en mai et moindre en novembre. Nous avons mesuré la respiration des deux terres au moyen de deux méthodes : le dégagement de gaz carbonique et l'absorption de l'oxygène. Dans l'ensemble, le taux de CO₂ dégagé s'élève pendant l'été et diminue au fur et à mesure que la saison se refroidit, puis le dégagement reprend vers le printemps. En début d'été, la respiration est semblable dans la

DATE	Lg	T
18 juillet	635	616
20 septembre	469	156
9 novembre	127	137
13 mars	-	392

Tableau 3 — Dégagement de gaz carbonique en mg de C-CO₂/m²/heure dans les anneaux de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et dans les terres témoin (T) en 1973 et 1974.

terre à *Leucopaxillus* et la terre témoin mais, à la fin de la saison, le dégagement devient trois fois plus intense dans l'anneau à *Leucopaxillus* (tableau 3). Edwards (1984) a décrit un phénomène similaire pour *Agaricus arvensis*. Ces mesures indiquent que la minéralisation du carbone organique est plus intense dans les anneaux à *Leucopaxillus*, ce qui ressortait déjà au vu des valeurs de carbone organique mesurées dans ces terres (voir plus haut). L'absorption de l'oxygène ne va pas dans le même sens que celui du dégagement de CO₂ mais les dosages ont été réalisés à une époque différente. Dans l'ensemble, la terre à *Leucopaxillus* absorbe beaucoup moins d'oxygène que la terre témoin (tableau 4). Avec l'addition de glucose, l'absorption d'oxygène se trouve fortement stimulée pour la terre à *Leucopaxillus* et, dans des proportions moindres, pour la terre témoin : par exemple, en novembre où l'absorption est particulièrement faible, l'addition de glucose l'augmente de 10 fois dans le cas de *Leucopaxillus* et seulement de 1,4 fois avec le témoin. En juin, l'augmentation est de 4,5 fois pour *Leucopaxillus* et de 1,8 avec pour le témoin. Les sucres réducteurs extraits des exsudats de racines de prairie ont un effet identique. On peut donc penser que, par rapport à la terre témoin, la terre à *Leucopaxillus* contient une plus forte biomasse, celle-ci souffrant d'un manque de glucides aisément assimilables, surtout à la fin de l'automne. Ce fait a été confirmé par des analyses radio-respirométriques effectuées par le professeur J. Mayaudon (Communication personnelle). Ce dernier a mélangé aux deux sols prélevés en septembre du glucose U14C et 114C. L'activité du sol à *Leucopaxillus* n'est que de 2 à 3 % par rapport aux 100 % du sol témoin. Ces différences expliqueraient en partie l'envahissement progressif du *Leucopaxillus* dans la prairie. On sait, en effet, que les racines des végétaux supérieurs excrètent des sucres et des acides aminés en fortes quantités, spécialement au printemps et lors des fortes luminosités (Vancura & Kunc, 1988). Le *Leucopaxillus* profiterait de ces excrétions radicellaires pour avancer dans la prairie. Sullia (1973) a montré que des extraits racinaires stimulaient fortement la croissance des moisissures rhizosphériques.

	Novembre	Juin
T	20	86
Lg	3,6	24
T + 4 mg de glucose	30	161
Lg + 4 mg de glucose	36	108
T + 4 mg de sucres réducteurs*	-	121
Lg + 4 mg de sucres réducteurs*	-	66

* sucres réducteurs issus des exsudats de racines de prairie

Tableau 4 — Absorption de l'oxygène en µl d'O₂/g de terre/heure dans les anneaux de *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et dans le témoin (T) en 1973 et 1974.

	Novembre 1972	Novembre 1973	Février 1974	Mai 1974	Juin 1974
Moisissures					
Lg	0,8	30	1	80	40
T	280	4300	350	290	1400
Actinomycètes					
Lg	800	900	50	2900	2000
T	1100	3300	2400	3200	29000
Bactéries					
Lg	750	1000	1900	19000	16000
T	800	2600	625	7100	108000

Tableau 5 — Analyse microbiologique de la terre envahie par *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et de la terre témoin (T). Nombre de moisissures, d'actinomycètes et de bactéries en milliers/g de terre, en 1972, 1973 et 1974.

Analyse microbiologique de la terre des anneaux

Nous avons calculé le nombre de différents groupements de microbes du sol selon la méthode de Pochon et Tardieux (1962). Deux échantillons sont prélevés : l'un dans la zone dénudée à *Leucopaxillus*, l'autre dans la terre témoin externe où le Basidiomycète n'a jamais poussé (Tableau 5).

Les moisissures subissent le recul le plus net. Elles se trouvent en nombre très inférieur dans la zone à *Leucopaxillus* mais ne disparaissent jamais complètement. Il subsiste des *Trichoderma viride*, des *Mucor*, des *Fusarium* (*F. culmorum*) et d'autres espèces. D'amples variations de nombre dépendent de l'année du prélèvement et de la saison. Warcup (1951) et Couderchet (1967) ont constaté le même phénomène pour d'autres Basidiomycètes. Comment les moisissures sont-elles éliminées ? Certainement pas par une substance inhibitrice comme la clitocybine puisque Hollande (1949) la déclare inactive sur les moisissures mais de préférence, comme le pense Couderchet, par compétition nutritionnelle.

Le nombre d'Actinomycètes connaît de profondes fluctuations suivant les prélèvements. Ils sont légèrement inhibés, sauf une fois en février où la zone à *Leucopaxillus* n'en possède presque plus et en mai où les deux valeurs sont égales.

L'ensemble des bactéries hétérotrophes aérobies subit, en général, une faible baisse dans les anneaux, excepté deux fois, en février et en mai, quand il y a stimulation. Peut-être est-ce dû, en février, à la suppression de l'action antagoniste exercée par les Actinomycètes. Couderchet (1967) note également une inhibition, plutôt indirecte, du *Lepista* sur la microflore bactérienne et, selon Melin *et al.* (1947), certaines espèces de *Marasmius* sont des producteurs actifs de substances antibactériennes.

Antagonisme du *Leucopaxillus giganteus* *in vitro* et *in vivo*

L'activité antibiotique de *Leucopaxillus giganteus* (s. n. *Clitocybe gigantea* variété *candida*) a été démontrée, dès 1945, par Hollande (1945, 1947) puis par Riviere *et al.* (1947). Ce champignon produit un antibiotique à large spectre puisqu'il inhibe et tue toutes les souches de bactéries Gram- et Gram+ ainsi que le bacille tuberculeux.

Souches testées	diamètre d'inhibition (mm)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16 net
<i>Escherichia coli</i> 548	14 net
<i>Bacillus mycoides</i> T4	16 net
<i>Micromonospora globosa</i>	1ère lecture 25 net 2nde lecture 12 peu net
Actinomycète n°1	1ère lecture 23 net 2nde lecture 15 peu net
Actinomycète n°2	19 net
Actinomycète n°3	26 net
Actinomycète n°6	21 net
<i>Penicillium</i> sp. 1	0
<i>Penicillium</i> sp. 2	1 ou 0
<i>Mucor</i> sp.	2 ou 0
<i>Trichoderma</i> sp.	1

Tableau 6 — Activité antagoniste de *Leucopaxillus giganteus* sur diverses souches de bactéries, d'Actinomycètes ou de moisissures. Diamètre de la zone d'inhibition en mm.

Nous avons prouvé à nouveau, avec une culture pure de *Leucopaxillus* provenant de spores, que ce champignon est antagoniste d'une grande variété de bactéries Gram+ et Gram — et de diverses souches d'Actinomycètes (tableau 6 et figure 3). La souche isolée de spores est beaucoup plus active que celle provenant d'un fragment du chapeau. Nous avons de même trouvé une action antagoniste avec du mycélium prélevé *in situ*, dans la terre de prairie. Le Basidiomycète semble très peu actif sur les moisissures, voire même sans effet : pour Hollande (1945), la clitocybine n'a aucune action sur elles. Avec plusieurs souches, nous avons observé une absence ou un très léger antagonisme.

La terre envahie par le mycélium du *Leucopaxillus* est exempte d'activité antagoniste. Selon la technique de Pink (1961), la terre a été séchée, broyée et placée dans de petits cylindres, en surface de la gélose. Nous avons élué avec des tampons de pH acides et alcalins : aucune activité antagoniste ne fut décelée autour des cylindres. Ce résultat concorde avec celui obtenu par Rivière *et al.* (1947) : après absorption sur charbon, alumine ou différentes argiles, pas un procédé d'éluion ne permet de récupérer la clitocybine ; cet échec tiendrait à une dénaturation de la protéine. On peut donc penser que, dans le sol *in situ*, seuls sont inhibés ou tués les bactéries ou les Actinomycètes qui se trouvent directement au contact du mycélium. A l'intérieur des grains de terre dépourvus de mycélium du Basidiomycète, une activité bactérienne normale est à prévoir.

Causes de la toxicité du Basidiomycète sur les phanérogames de la prairie.

Le *Leucopaxillus* fait partie du groupe des basidiomycètes qui détruisent les phanérogames des prairies (groupe 1) et nous nous sommes demandé quels facteurs léthaux pouvaient être en cause. Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, nous avons mélangé en quantités égales des extraits de terre envahis par le *Leucopaxillus* avec du liquide de culture du cresson et mesuré la croissance de celui-ci après 8 jours. Nous n'avons constaté aucune inhibition des plantules qui ont un bel aspect et des racines normalement

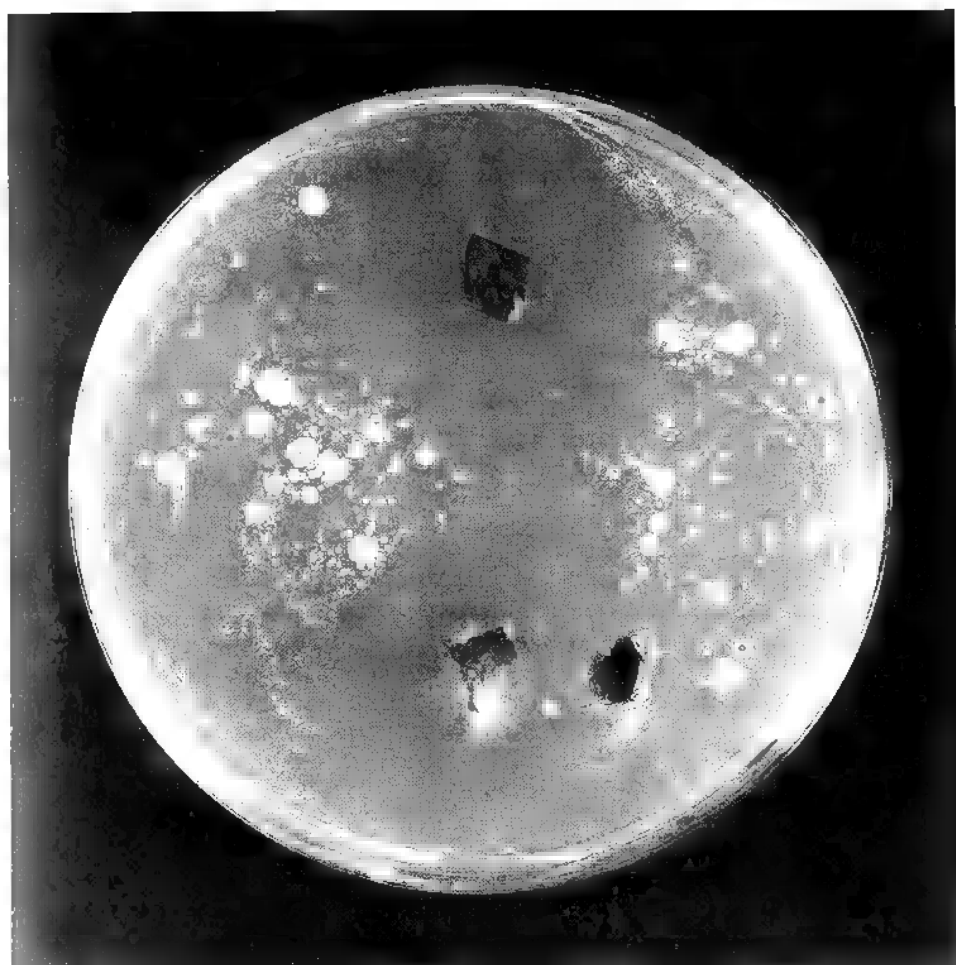


Fig. 3 — Antagonisme exercé par le mycélium de *Leucopaxillus giganteus* sur la microflore du sol de prairie. Deux carrés de mycélium (en noir) ont été déposés sur une boîte de milieu gélosé,ensemencée par 0,1 ml d'une dilution 10^{-4} de sol de prairie. Autour des carrés de mycélium, on distingue nettement une zone de 3-4 cm de diamètre dépourvue de colonies microbiennes.

développées. Il n'y a donc pas de produits phytotoxiques dans ces extraits. Par contre, si on cultive le *Leucopaxillus* sur un milieu à base de peptone et que le liquide soit mélangé au milieu pour plantules, la croissance des racines de cresson est fortement inhibée (racines brunes, courtes ou inexistantes) et la hauteur des plantules réduite de moitié : des produits phytotoxiques sont alors présents dans le liquide de culture du *Leucopaxillus*. Il y aurait plusieurs causes à la mortalité des phanérogames : 1) une asphyxie des plantes (comme nous l'avons vu plus haut, le mycélium recouvre densément stolons et racines) ; 2) une

	profondeur (cm)	humidité (%)
Lg	0 - 2	15,4
	2 - 3	25,2
	7 - 10	23
T	0 - 2	24,5
	7 - 10	18,8

Tableau 7 -- Humidité (%) en fonction de la profondeur dans le sol à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et le sol témoin (T).

dessiccation de la terre envahie par le mycélium, d'où un manque d'eau pour la plante. Nous avons fait une mesure d'humidité du sol, début juin (tableau 7). La surface de la terre envahie par le *Leucopaxillus* est desséchée par rapport à la terre témoin.

La dessiccation par la multiplication du mycélium a été rapportée par presque tous les auteurs. Edwards (1984) et Couderchet (1967) pensent que la mortalité des phanérogames vient en partie du manque d'eau. Des substances toxiques interviendraient aussi, comme le cyanure d'hydrogène excrété par le *Marasmius oreades* (Lebeau & Hawn, 1963 ; Smith, 1980). Nous n'avons pas pu en mettre en évidence dans la terre envahie par le mycélium de notre champignon. Par contre, ce dernier en dégage lorsqu'il est cultivé au laboratoire sur des milieux peptonés. Le *Leucopaxillus* excrète la clitocybine qui exerce une action nécrosante sur les tissus (Rivière *et al.*, 1947) ; or, les stolons et les racines des phanérogames sont recouverts directement par le mycélium du *Leucopaxillus* et, par conséquent, soumis à l'action nécrosante de la clitocybine. Reste l'ammoniaque, accumulé dans les anneaux. Maze (1925 *in* Moliard, 1925) indique que des teneurs de 10,5 mg d'azote ammoniacal / 100 mg de terre intoxiquent le maïs. Nos résultats sont bien supérieurs à ces données. Au mois de juin, nous avons dosé l'azote ammoniacal suivant la profondeur de l'échantillon (tableau 8). La teneur maximale en ammoniaque se situe dans la couche superficielle, là où se trouve la densité maximale de racines, de stolons et de mycélium. L'ammoniaque libéré par le *Leucopaxillus* expliquerait donc, à lui seul, l'action létale du *Leucopaxillus* sur les phanérogames ; c'est aussi l'avis de Couderchet (1967). En résumé, plusieurs causes peuvent déterminer la mort des phanérogames : l'asphyxie, la dessiccation, la clitocybine, l'ammoniaque.

Développement du *Leucopaxillus giganteus* en laboratoire

Développement sur milieu terre

Deux souches sont isolées : l'une à partir de spores, l'autre à partir d'un morceau de sporophore de *Leucopaxillus*. Les deux souches ont été cultivées sur gélose malt-peptone et entretenues sur ce milieu. A partir de cultures en boîtes, on prélève des morceaux de 1,5 cm de côté qui servent à inoculer les Erlenmeyers contenant de la terre ou des racines de plantes de la prairie. La terre subit trois traitements : stérilisation à l'autoclave, stérilisation et réinoculation avec une suspension-dilution de terre au 1/10, terre non traitée. La terre est incubée à 18° et à 4° C. Les morceaux de mycélium sont placés au centre de l'Erlenmeyer à la surface de la terre et les résultats de la croissance notés après 15 jours, 1, 2, 4 mois d'incubation. Le mycélium du *Leucopaxillus* se développe très bien sur la terre stérile. On obtient un développement maximal en un mois, à 18° C. A 4° C.

Profondeur (cm)	Lg	T
0 - 2	74	3,5
2 - 3	36	-
7 - 10	7	2,5

Tableau 8 — Quantité d'azote ammoniacal (mg/100g de terre) en fonction de la profondeur dans le sol à *Leucopaxillus giganteus* (Lg) et le sol témoin (T).

la croissance se révèle beaucoup plus lente et n'atteint pas encore le développement maximal après 4 mois d'incubation. Sur racines stériles, la croissance est plus abondante. Par contre, sur terre ou racines non stériles ou sur terre stérile réinoculée, elle s'avère nulle à 18° C et faible ou très faible à 4° C (figures 4, 5). Des résultats similaires sont obtenus lorsque l'inoculum provient d'une culture sur terre à + 4° C. Nous avons fait varier les substrats et les conditions d'incubation en utilisant, par exemple, des blocs de pelouses incubés à l'air ou en sacs plastiques et à différentes températures mais les résultats étaient identiques. On peut donc conclure que le mycélium de *Leucopaxillus* subit, de la part de la microflore du sol, un fort antagonisme, lequel est atténué à basse température où le *Leucopaxillus* trouve une moindre résistance. Cela se confirme par le fait qu'à + 4° C, seule une faible proportion de moisissures, isolées du sol témoin, pousse correctement (4 souches sur 24) alors que le *Leucopaxillus* croît à cette température. Dans les tests d'antagonisme, il peut même chevaucher le mycélium de quelques moisissures avant même qu'elles puissent apparaître.

Gramss (1981) a lui aussi décrit cet antagonisme du sol vis-à-vis des Basidiomycètes. Sur 17 terres étudiées, 15 inhibent complètement le développement des mycéliums et dans les 2 terres non inhibitrices, les *Agaricus* refusent de se multiplier. Les autres Basidiomycètes croissent grâce à la présence de plantes cultivées bien déterminées. Selon Gramss (1985), l'inhibition de la croissance des Basidiomycètes serait due à des composés volatils provenant de la décomposition des végétaux supérieurs. Boyle (1995) a montré qu'il fallait éliminer les moisissures par du Bénomyl pour réussir l'introduction d'un Basidiomycète. D'après Kackley *et al.* (1989), le Bénomyl n'influence pas le développement des Basidiomycètes à rond de sorcière.

Développement sur milieux de culture semi-synthétiques et synthétiques

A partir du milieu de Zschöckle (1951), nous avons composé un milieu simple (voir matériel et méthode) dans lequel nous avons estimé les meilleures sources d'azote et de carbone par pesée du mycélium (résultats non figurés).

Source d'azote : L'azote organique complexe (peptones) fournit la meilleure source d'azote. La bactopeptone (Difco) dont on ne connaît pas le procédé de fabrication est la meilleure peptone. Sur peptone de caséine, le milieu a tendance à brunir. D'autres sources d'azote peuvent servir comme le glutamate mais l'alanine, l'asparagine ou le chlorure d'ammonium constituent des sources d'azote médiocres.

Source de carbone : Le *Leucopaxillus* utilise une grande variété de glucides sur milieu peptone. Il croît sur : glucose, galactose, fructose, xylose, saccharose, maltose, lactose, cellobiose, mannitol, amidon pectine, CMC, inuline. La croissance, partiellement inhibée par le lactose, l'est fortement par l'arabinose bien que ces deux sucres soient utilisés. Le *Leucopaxillus* ne digère pas la cellulose, l'alcalilignine ni l'acide humique.

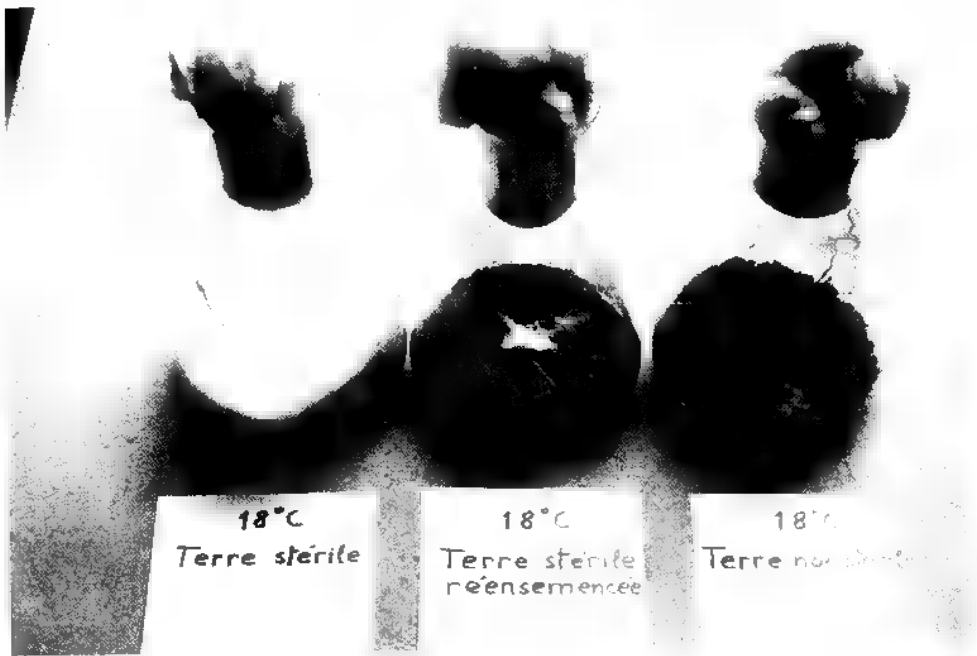


Fig. 4 — Croissance du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* à 18° C sur la terre de prairie stérile (à gauche) et non stérile (à droite).

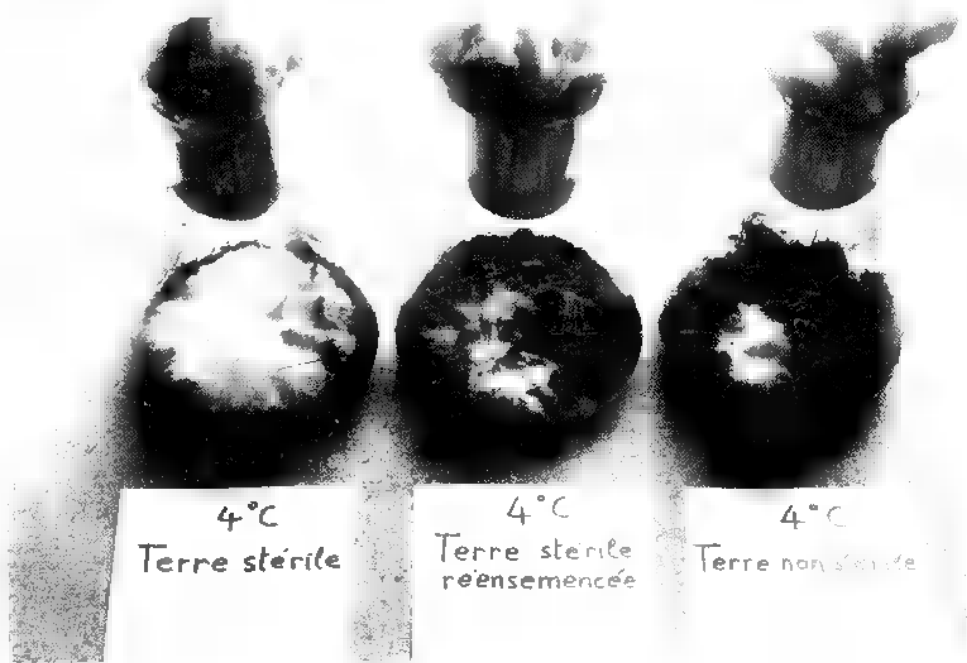


Fig. 5 — Croissance du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* à 4° C sur la terre de prairie stérile (à gauche) et non stérile (à droite).

Mathur (1970) démontre que *Marasmius oreades*, en culture pure non agitée, assimile des fractions d'humus provenant de sources très différentes. La croissance est très stimulée (+ 50 %) par le bouillon de carottes ; Hollande (1945) avait déjà noté ce fait. En présence de glucides, les milieux sont acidifiés, excepté pour le saccharose, l'inuline, le mannitol, la CMC.

Leucopaxillus utilise le dextrane, un polyside bactérien. Nous avons réussi le développement du *Leucopaxillus* à la surface de tapis bactériens incubés à basse température. Les bactéries, isolées de la rhizosphère du sol témoin, avaient été cultivées sur un milieu pauvre en azote organique ou avec de l'azote ammoniacal. Or, 80 % des bactéries de la rhizosphère sont capsulées et synthétisent des polysides (Webley *et al.*, 1965). Par contre, le *Leucopaxillus* refuse de croître sur tapis de moisissure.

Une bonne croissance s'effectue sur milieu malt-peptone liquide ou gélosé. Elle est inhibée par l'azoture de sodium (0,1 g/l-1) et le bicarbonate de sodium (2 g/l).

Discussions et conclusions

La multiplication du mycélium de *Leucopaxillus giganteus* dans le sol d'une prairie est limitée dans le temps : de la fin de l'hiver jusqu'au début du printemps. L'avancement du mycélium en forme d'anneaux s'effectue irrégulièrement et la progression est d'autant plus forte que la saison est froide et humide. Sa multiplication va entraîner un certain nombre de modifications : mort des phanérogames, élimination des moisissures, hausse du pH par production d'ammoniaque, stimulation de plusieurs enzymes et accélération de la minéralisation du carbone et de l'azote organiques. Ces perturbations, communes à d'autres Basidiomycètes se développant en cercle dans les prairies, ont été décrites par plusieurs auteurs (Coudéchet, 1967 ; Edwards, 1984). Les cultures de *Leucopaxillus* sur terre au laboratoire révèlent qu'en présence de la microflore naturelle du sol, le mycélium du Basidiomycète a beaucoup de mal à s'imposer et ne peut croître, de façon limitée, qu'à basse température. Ces observations *in vivo* et *in vitro* laissent penser que le *Leucopaxillus* profite d'un vide biologique pour dominer la microflore au repos. En effet, il se multiplie assez bien à basse température, ce qui n'est pas le cas de la majorité des moisissures et des bactéries de ce sol. En hiver, le *Leucopaxillus* supplanterait les moisissures avant même que ces dernières ne se développent. Boyle (1995) a montré qu'il fallait éliminer les moisissures pour réussir l'introduction d'un Basidiomycète. Mais intervient aussi le facteur nutritionnel : l'observation *in situ* nous montre un mycélium collé à la surface des stolons et des racines qui doit tirer parti des exsudats radicellaires et des polysaccharides bactériens, faits corroborés par les expériences *in vitro* : sa respiration est fortement stimulée par des extraits radicellaires sucrés et il peut croître à la surface de tapis bactériens. Pourrait-il s'imposer grâce à son antibiotique, la clitocybine ? Pas complètement, car celle-ci n'a de prise que sur les bactéries et les actinomycètes, non sur les moisissures. Pourtant, ce sont précisément ces dernières qui sont éliminées lors de l'avancement, les bactéries et les actinomycètes souffrant moins de sa présence. Nous n'avons pas observé de mycélium reliant l'ancien cercle au nouveau ; sans doute la progression s'effectue-t-elle grâce aux spores. En conclusion, on ne sait pas encore exactement comment le Basidiomycète s'impose temporairement dans le sol de prairie mais on constate qu'il a besoin, pour ce faire, d'un vide biologique et d'un nutriment approprié.

BIBLIOGRAPHIE

- BACHELIER G., 1973 — Activité biologique des sols et techniques simples qui en permettent l'évaluation. *Cahiers Orstom, série Pédologie* 1 : 65-77.
- BECKER G., 1990 — *La vie privée des champignons*. Maloine SA ed. pp. 103-112.
- BOYLE C. D., 1995 — Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organo-pollutants in soil. *Canadian journal of microbiology* 41 : 345-353.
- COUDERCHET J., 1967 — Action du Basidiomycète *Rhodopaxillus saevis* (d'un rond de sorcière) sur la microflore tellurique. *Revue générale de botanique* 74 : 107-134.
- DOMSCH K. H., BECK T., ANDERSON J. P., SÖDERSTRÖM B., PARKINSON D. & TROLL-DENIER G., 1979 — A comparison of methods for soil microbial population and biomass studies. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 42 : 520-533.
- EDWARDS P. J., 1984 — The growth of fairy rings of *Agaricus arvensis* and their effect upon grassland vegetation and soil. *Journal of ecology* 72 : 505-513.
- FENWICK H. S., 1976 — Fairy rings in lawns. *Publ. Agric. Exp. Stu. a related Inst* 325, 2 p.
- FISHER R. F., 1977 — Nitrogen and phosphorus mobilization by the fairy ring fungus *Marasmius oreades* Bolt ex. Fr. *Soil biology and biochemistry* 9 : 239-241.
- GRAMSS G., 1981 — New method for observation of soil-inhabiting fungal mycelia introduced into balanced plant-soil systems. *Zentralblatt für Bakteriologie, II Abteilung* 136 : 317-323.
- GRAMSS G., 1985 — Approach to the nature of volatile compounds that dominate the ecological niche of Basidiomycetous ground fungi in the edaphosphere of grassland. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 140 : 597-606.
- GRUNDA B., 1976 — Effects of fungal fairy rings on soil properties. *Ceska Mykologie* 30(1) : 27-32.
- HOFFMAN G. G., 1967 — Photometric determination of phosphatase activity in soil. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde* 118 : 161-172.
- HOFFMAN G. G. & TEICHER K., 1961 — Ein kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung der Ureaseaktivität in Boden. *Zeitschrift für Pflanzenernährung, Düngung und Bodenkunde* 95 : 55-63.
- HOLLANDE M. A., 1945 — Lyse massive des bacilles de Koch chez le cobaye après traitement à la clitocybine. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 221 : 361-364.
- HOLLANDE M. A., 1947 — La bactériostase et la bactériolyse du bacille tuberculeux par la clitocybine. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 224 : 1534-1537.
- HOLLANDE M. A., 1949 — A propos de la clitocybine cristallisée. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 228 : 1758-1762.
- KAISER P. & MONZON DE ASCONEGUI M. S., 1972 — Mesure de l'activité des enzymes pectinolytiques dans le sol. *Bulletin de biologie du sol* 14 : 16-19.
- KAKLEY K. E., DEMOEDEN P. H. & GRAYBANKAS A. P., 1989 — Effect of fungicides on the occurrence and growth in vitro of Basidiomycetes associated with superficial fairy rings in creeping bentgrass. *Plant disease* 73 : 127-130.
- LEBEAU J. B. & HAWN E. J., 1963 — Formation of HCN by the mycelial stage of fairy ring fungus. *Phytopathology* 53 : 1395-1396.
- MATHUR S. P., 1970 — Degradation of soil humus by the fairy ring mushroom. *Plant and soil* 33 : 717-720.
- MELIN E., WIKEN T. & OBLOM K., 1947 — Antibiotic agents in the substrates from cultures of the genus *Marasmius*. *Nature (London)* 159 : 840-841.
- MOLLIARD M., 1910 — De l'action du *Marasmius oreades* Fr. sur la végétation. *Bulletin de la société botanique de France* 57 : 62-70.
- MOLLIARD M., 1925 — *Nutrition de la plante. IV Cycle de l'azote*. Doin ed., Paris. pp. 71-72.
- NELSON N., 1944 — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of biological chemistry* 153 : 375-380.

- NORSTADT F. A., FREY C. R. & SIGG H., 1973 — Soil urease : Paucity in the presence of the fairy ring fungus *Marasmius oreades* (Bolt) Fr. *Soil science society of America proceedings* 37 : 880-885.
- PINK L. A., 1961 — Antibiotics in soils. II Extent and mechanism of release. *Soil science* 91 : 94-99.
- POCHON J. & TARDIEUX P., 1962 — *Techniques d'analyses en microbiologie du sol*. La Tourelle ed. St. Mandé, France. pp. 29-42.
- RIVIÈRE C., THÉLY M. & GAUTRON G., 1947a — Contribution à l'étude des principes antibiotiques extraits du *Clitocybe candida*. *Bulletin de la société de chimie biologique*, 29 : 857-863.
- RIVIÈRE C., THÉLY M. & GAUTRON G., 1947b — Étude de la clitocybine, principe antibiotique extrait du *Clitocybe candida*. *Comptes rendus de l'académie des sciences, Paris* 225 : 1386-1390.
- SHANTZ H. L. & PIEMEISEL R. L., 1917 — Fungus fairy rings in Eastern Colorado and their effect on vegetation. *Journal of agricultural research* 11 : 191-245.
- SIMS R. J. & JACKSON G. D., 1971 — Rapid analysis of soil nitrate with chromotropic acid. *Proceedings, soil science society of America*, 3 : 603-606.
- SMITH J. D., 1980 — Is biological control of *Marasmius oreades* fairy rings possible ? *Plant disease*, 64 : 348-355.
- SOMOGYI M., 1945 — A new reagent for the determination of sugars. *Journal of biological chemistry* 160 : 61-68.
- SULLIA S. B., 1973 — Effect of root exudates and extracts on rhizosphere fungi. *Plant and soil* 39(1) : 197-200.
- TOOHEY J. L., 1983 — Fungi fairy rings in soil : Etiology and chemical ecology. *Canadian field-naturalist* 97 : 9-15.
- UMBREIT W. W., BURRIS R. H. & STAUFFER J. F., 1964 — *Manometric techniques*. 4th ed. Burgess Publish Compagny, Minneapolis. pp. 1-17.
- VANCURA V. & KUNC F., 1988 — *Soil microbial associations*. Elsevier ed., New York. pp. 79-113.
- WARCUP J. H., 1951 — Studies on the growth of Basidiomycetes in soil. *Annals of botany, London* 15 : 305-317.
- WEBLEY D. M., DUFF R. B., BACON J. S. D. & FARMER V. C., 1965 — A study of polysaccharide-producing organisms occurring in the root region of certain pasture grasses. *Journal of soil science* 16 : 149-157.
- ZSCHEILE F. P., 1951 — Nutrient studies with the wheat bunt fungus *Tilletia caries* (DC.) Tul. *Phytopathology* 41 : 1115-1124.

INFLUENCE DE LA MONENSINE SUR L'ULTRASTRUCTURE ET LA COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES FRACTIONS PARIETALES DU *BOTRYTIS CINEREA*.

YAHYA KOULALI^{1,2}, ABBES ES-SGAOURI¹ et ROBERT DARGENT²(*)

¹Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales,
Faculté des Sciences I — Ain Chock,
Université Hassan II, Km 8, Route El Jadida,
B.P. 5366 Maarif, Casablanca, Maroc.

²Laboratoire de Mycologie Végétale,
Université Paul Sabatier, 118, Route de Narbonne,
31062 Toulouse CEDEX, France

(*) Auteur à qui faire parvenir toute correspondance.

RÉSUMÉ : Les effets de la monensine sur la morphogénèse et la composition chimique des différentes fractions pariétales du *Botrytis cinerea* ont été étudiées. Cet ionophore inhibe la croissance, modifie l'ultrastructure et induit des variations dans la proportion des différents monomères qui se traduisent par la diminution des oses neutres et des acides aminés et l'augmentation du phosphore inorganique et des oses aminés (chitine) en particulier dans la fraction 4. Ces modifications montrent que la monensine affecte le trafic vésiculaire ainsi que les enzymes responsables de la synthèse pariétale et donc d'une croissance normale.

MOTS CLEFS : *Botrytis cinerea* ; Monensine ; Ultrastructure ; Fractions pariétales.

SUMMARY : The effects of monensin on morphogenesis and chemical composition of wall fractions of *Botrytis cinerea* were studied. The ionophore inhibits the fungal growth, modifies the ultrastructure and induces modifications of various monomers. We observed the decrease of neutral sugars, amino acids and uronic acids, and an increase of inorganic phosphorus and amino sugars (chitin) specially in fraction F4. These results show that monensin affects the vesicular traffic and enzymes responsible for normal wall synthesis and therefore normal growth.

KEY WORDS : *Botrytis cinerea* ; Monensin ; Ultrastructural ; Wall fractions.

INTRODUCTION

Les champignons filamenteux ont un mode de croissance apicale caractérisé par une distribution polarisée des différents systèmes endomembranaires (Wessels, 1986).

L'insertion de façon continue de nouveaux matériaux dans la paroi cellulaire au niveau de l'apex, assure la croissance de l'hyphé fongique (Prosser & Trinci, 1979 ; Gooday & Trinci, 1980). De plus, les précurseurs pariétaux, les enzymes et leurs substances régulatrices sont transportés à l'apex dans des vésicules golgiennes, suivant des processus sécrétoires très organisés (Cabib *et al.*, 1979 ; Gooday, 1983). La monensine, ionophore carboxylique qui se lie aux ions Na^+ , K^+ et à des protons (Pressman & Fahim, 1982) provoque la vacuolisation de l'appareil de Golgi et modifie ainsi les processus sécrétoires aussi bien chez les cellules animales que végétales (Mollenhauer *et al.*, 1990 ; Calzoni *et al.*, 1993 ; Ciampolini *et al.*, 1993 ; Kimura *et al.*, 1993 ; Hoffmann-Benning *et al.*, 1994 ; Bou-Gharios *et al.*, 1994).

Des travaux ont montré que les champignons sont sensibles à la monensine (Liu, 1982). L'ionophore a une influence sur la morphogenèse fongique (Poli *et al.*, 1986 ; Sewall *et al.*, 1986 ; Pancaldi *et al.*, 1994). Il inhibe la croissance et la biosynthèse des lipides (Weete *et al.*, 1989 ; Fonvieille *et al.*, 1991) ainsi que la sécrétion des cutinases chez *Fusarium solani* (Podila *et al.*, 1995). Dans un précédent travail (Koulali *et al.*, 1992, 1996a,b), nous avons montré que la monensine modifie la composition globale des parois, du plasmalemme ainsi que la sécrétion et la structure des exopolysaccharides de champignons appartenant à différents groupes taxonomiques. Dans le présent travail nous décrirons les effets de la monensine sur la croissance, l'ultrastructure et la composition des différentes fractions pariétales du *Botrytis cinerea*.

MATERIEL ET METHODES

Matériel biologique

Botrytis cinerea Pers. provient du Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn (Pays-Bas).

Techniques générales

Le milieu expérimental de culture a été décrit antérieurement par Thomas (1972). Ce milieu liquide a été mis dans des fioles de Roux à section trapézoïdale à raison de 100 ml par fiole puis stérilisé à l'autoclave à 110° C pendant 20 min. Les ensemencements ont été faits à partir d'une suspension mycélienne issue de précultures âgées de 6 jours, broyées stérilement à l'ultra turax pendant 30 secondes.

Préparation de la monensine

A partir d'une solution mère de monensine dissoute dans l'éthanol à 90° (50 µg/ µl), nous avons effectué des dilutions de telle manière à obtenir la concentration de 10 µg/ml. La monensine est ajoutée aseptiquement au milieu de culture avant l'ensemencement.

Conditions de développement

Les cultures en condition statique sont mises à incuber à 24° C et à l'obscurité.

Mesure de la croissance

La détermination de ce paramètre est réalisée par la technique des masses sèches. A intervalles réguliers, le mycélium est desséché à 80° C jusqu'à masse constante (24 h). Les résultats représentent la moyenne des masses obtenues à partir de cinq erlenmeyers de culture récupérées tous les 2 jours.

Techniques microscopiques

Afin d'avoir des hyphes facilement orientables et dans le but d'obtenir des coupes ultrafines passant au niveau des zones apicales, nous avons repris une technique décrite par Dargent (1977). L'inoculum de *B. cinerea* est déposé sur un film de cellophane recouvrant un milieu nutritif gélosé (avec et sans monensine). Quand la culture, dont l'âge n'excède jamais 48 heures, a atteint le développement souhaité, nous découpons délicatement le film de cellophane en suivant rigoureusement les bords de la colonie. Ensuite, nous plongeons très rapidement l'ensemble cellophane, filaments mycéliens dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2 évitant ainsi les risques d'artéfacts au niveau des zones apicales des filaments. Après post-fixation dans le tétroxyde d'osmium, les échantillons sont deshydratés dans l'alcool. A la fin de la deshydratation, nous découpons de petits carrés d'1 mm² environ, en ayant soin de ne prendre que la zone terminale des hyphes. Ces carrés, après imprégnation dans l'Epon 812 ou le Spurr sont déposés à plat dans une goutte de résine fraîche, à la surface d'une gélule tronquée. Après polymérisation, des coupes longitudinales passant dans les zones apicales des filaments sont obtenues sur ultramicrotome Reichert OMU3. Comprises entre 400 et 800 Å elles sont recueillies soit sur des grilles en cuivre de 200 mesh et soumises à la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb, soit sur des grilles en or et soumises à la coloration de Thiery (1967) pour la mise en évidence des groupements vic-glycol.

Les fractions pariétales sont mises en suspension aqueuse par passage rapide aux ultrasons et une goutte est disposée sur une grille en cuivre de 200 mesh. Un ombrage rotatif au platine est effectué sous un angle d'environ 10 degrés sous un évaporateur rotatif Riber.

Toutes les observations sont faites avec un microscope Philips EM 301 travaillant sous une tension de 80 KV.

Préparation du complexe WGA-or colloïdal et marquage cytochimique

L'or colloïdal (Au17) a été préparé selon la méthode de Geoghegan & Ackerman (1977). La WGA (IBF) a été conjuguée à la suspension d'or colloïdal suivant la technique décrite par Roberts *et al.* (1983). Pour le marquage cytochimique, les coupes sont montées sur grilles en or ou nickel. Ces grilles sont d'abord déposées sur une goutte de tampon phosphate (P.B.S.) 0,05 M, pH 7,0, puis mises sur le complexe WGA-or colloïdal durant des temps variables de 20 minutes à 2 heures. Après incubation, les coupes soigneusement

lavées dans du tampon P.B.S. et dans de l'eau distillée sont soumises à la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb. Pour démontrer la spécificité du marquage, plusieurs témoins sont réalisés :

- incubation des coupes avec le complexe WGA-or colloïdal préalablement neutralisé avec le N-N'-N'' triacétylchitotriose (2mM).
- incubation des coupes avec le complexe albumine-or à la place du complexe lectine-or.
- incubation des coupes avec l'or colloïdal seul.

Isolement, purification et fractionnement des parois

L'isolement et la purification des parois ont été décrits antérieurement (Koulali *et al.*, 1992). Le fractionnement est réalisé selon la méthode de Mahadevan & Tatum (1965) par traitement successifs aux alcalis et aux acides résumés dans la Fig. 1.

Techniques biochimiques

L'hydrolyse des fractions pariétales en vue de l'analyse des oses neutres a été réalisée à l'aide d'H₂SO₄ 22 N pendant 5 min à 50° C et d'H₂SO₄ 2 N pendant 15 h à 100° C (Harris & Taber, 1973). Les oses neutres totaux ont été dosés par la méthode à l'antrone (Mokrash, 1954), par celle au phénol sulfurique (Hodge & Hofreiter, 1962), ou par celle des oses réducteurs selon Somogyi (1952). Le dosage des acides uroniques a été effectué à partir du même hydrolysats selon la méthode de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

En vue de l'analyse des oses aminés, les fractions pariétales ont été hydrolysées à l'HCl 6 N pendant 6 h à 100° C. Les hydrolysats ont été récupérés par filtration, évaporés à sec et repris plusieurs fois par l'eau distillée jusqu'à élimination complète de l'acide. Le dosage des oses aminés a été effectué en utilisant la méthode d'Elson-Morgan modifiée (Tracey, 1955). Le dosage des acides aminés totaux provenant d'une hydrolyse à l'HCl 6 N pendant 15 h à l'étuve, à 100° C, a été réalisé selon la méthode de Spies (1957).

RESULTATS

Dans des expériences préliminaires, nous avons déterminé la tolérance de plusieurs espèces de champignons vis-à-vis de la monensine et constaté que le *B. cinerea* était l'une des espèces les plus sensibles à cet effecteur. La concentration de 10 µg/ml de monensine, seulement fongistatique, représente la concentration minimale qui donne le maximum d'effets (Koulali, 1992).

Évaluation de la croissance :

Nous avons étudié la croissance du *B. cinerea* sur milieu synthétique dans lequel nous avons ajouté de la monensine à la concentration de 10 µg/ml. Durant cette expé-

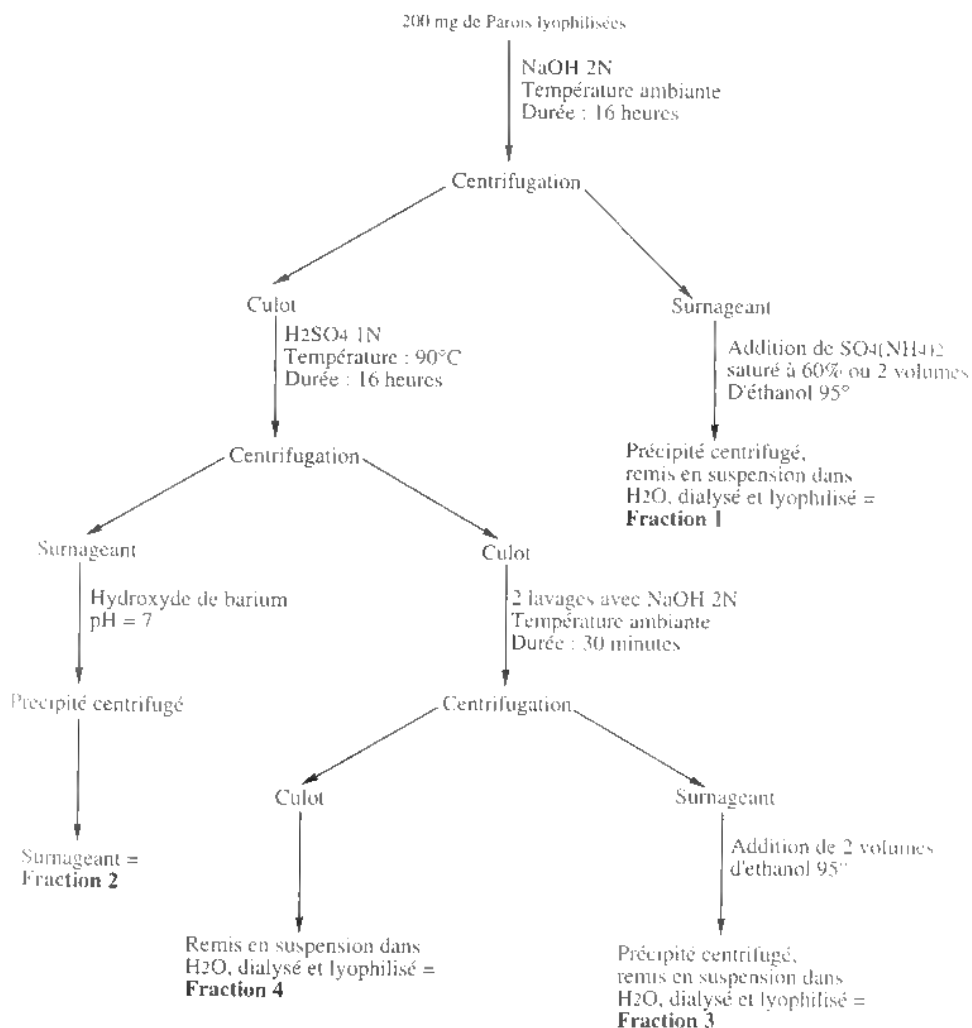


Fig. 1 : Fractionnement des parois selon Mahadevan & Tatum (1965)

rience, nous avons pris soin de réaliser deux contrôles : le milieu synthétique avec le solvant (10 µl d'éthanol) et le milieu synthétique seul. Toutefois, comme la présence du solvant n'entraîne aucune modification de la croissance et qu'il y a une grande similarité entre les masses sèches obtenues en fonction du temps, nous ne donnerons qu'une courbe témoin. La figure 2 résume les résultats obtenus. Nous constatons que la courbe témoin est caractéristique des courbes de croissance fongique : (i) une phase de latence n'excédant jamais plus de 48 h ; (ii) une croissance exponentielle caractérisée par un important accroissement de la masse, le maximum de croissance étant atteint au 12^e jour de culture ; (iii) enfin un état stationnaire, caractérisé par une masse de matière sèche stable.

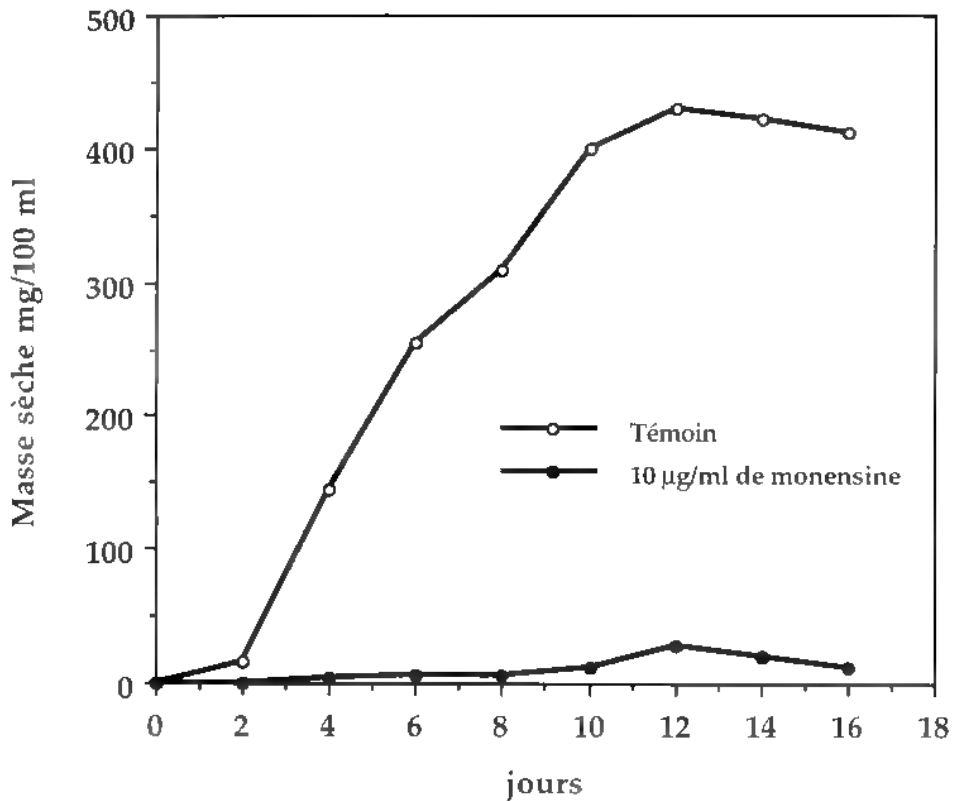


Fig. 2 : Effet de la monensine sur la croissance du *B. cinerea*

Fig. 3. — Organisation cytologique des zones apicales en croissance du *Botrytis cinerea*.

a-b-d-e : glutaraldéhyde-tétraoxyde d'osmium ; acétate d'uranyle-citrate de plomb ;

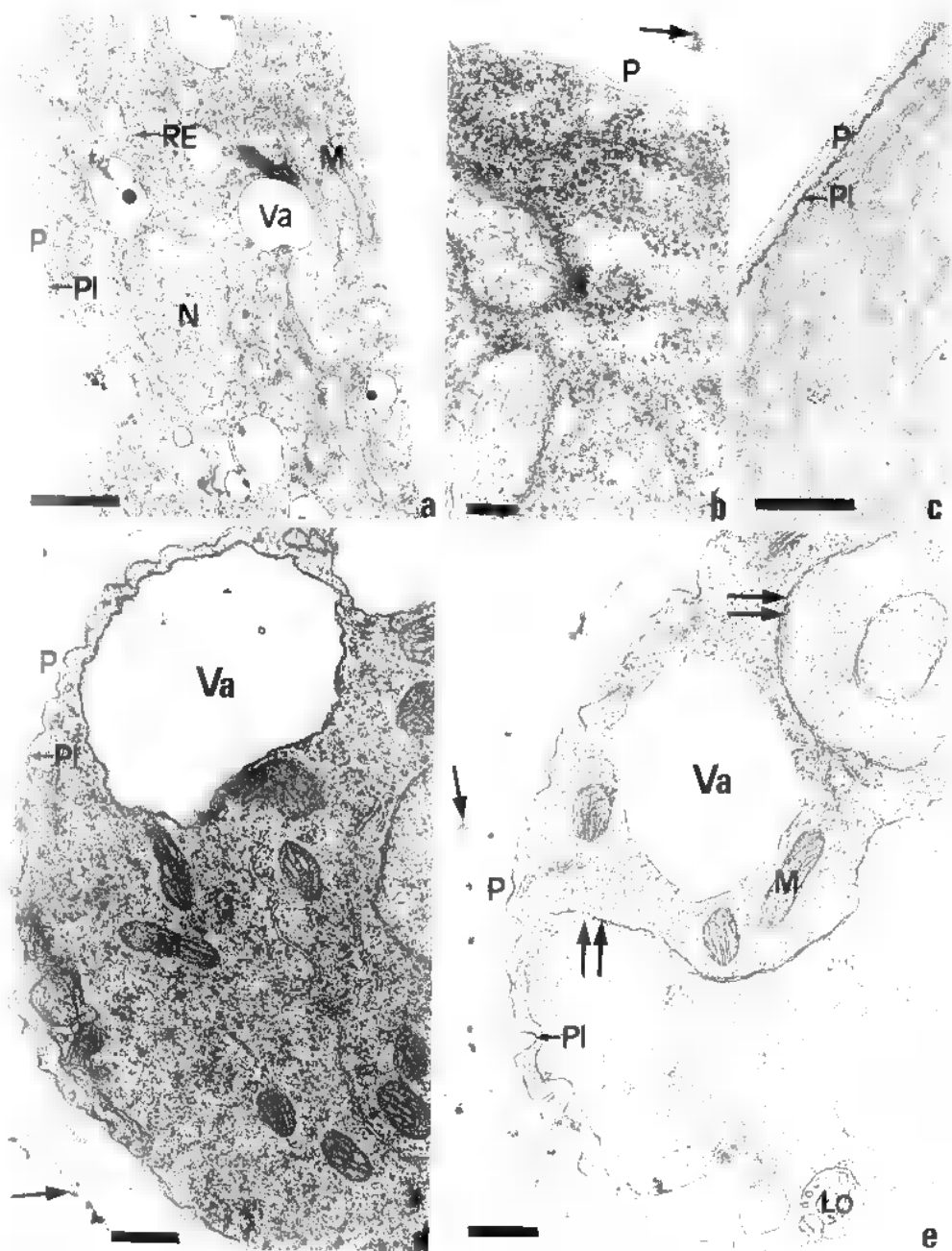
c : glutaraldéhyde-tétraoxyde d'osmium ; acide périodique-thiocarbo-hydraside-protéinate d'argent.

a — Coupe longitudinale passant dans la zone nucléaire d'une hyphes témoin. La Paroi (P) est transparente aux électrons et le plasmalemme est rectiligne (Pl). Le cytoplasme renferme des noyaux (N), des mitochondries (M) et du réticulum endoplasmique (RE). Dans cette zone apparaissent les premières vacuoles (Va). Echelle : 1 µ.

b — Coupe transversale passant dans la zone apicale en croissance d'une hyphes témoin. La Paroi (P) est limitée extérieurement par un réseau fibrillaire d'exopolysaccharides plus ou moins dense aux électrons (flèche). Echelle : 0,1 µ.

c — Coupe longitudinale passant dans la zone apicale en croissance d'une hyphes témoin. La détection des polysaccharides par le test de Thiery montre une réaction intense au niveau de la paroi (P) et du plasmalemme (Pl). Echelle : 0,5 µ.

d-e — Coupes transversales passant dans les zones apicales en croissance d'une hyphes se développant en présence de monensine à la concentration de 10 µg/ml. La paroi (P), limitée extérieurement par des exopolysaccharides (flèche), est plus épaisse et apparaît constituée de deux couches. Le plasmalemme (Pl) est fortement festonné et les mitochondries (M) ont une matrice dense aux électrons. On note l'apparition très rapide de grandes vacuoles (Va). Des lomasomes (Lo) et des structures lytiques (double flèches), séquestrant des territoires cytoplasmiques, peuvent s'observer. Echelle : 0,5 µ.



fractions	<i>A. bisexualis</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>S. rolfsii</i>	
	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine
F1	22,64	17,57	20,21	14,46	31,48	25,96
F2	22,81	35,90	37,64	34,66	32,02	42,84
F3	26,54	20,20	21,23	20,68	12,62	8,58
F4	28,01	26,33	21,27	30,20	23,88	22,61

Tableau 1 : Pourcentage des fractions pariétales en présence et en absence de monensine

La présence de monensine diminue fortement le développement mycélien. Les pourcentages d'inhibition sont compris entre 93 % (12^e jour : maximum de croissance) et 100 %.

Morphologie ultrastructurale

Les coupes ont été réalisées dans les parties apicales des hyphes. Sur milieu témoin, le diamètre des hyphes varie entre 2,5 et 3 μ et l'épaisseur de la paroi n'excède pas 800 Å (Fig. 3,a). La paroi apparaît amorphe, dépourvue de stratification apparente, faiblement contrastée aux électrons après la double coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb. Elle possède extérieurement un fin réseau fibrillaire d'exopolysaccharides plus dense aux électrons (Fig. 3.b). La réaction de Thiery donne un résultat positif et uniforme pour l'ensemble. Le plasmalemme est régulier et le cytoplasme renferme les différents systèmes endomembranaires (Fig. 3,c).

En présence de monensine (Fig. 3,d-e), le diamètre des hyphes est légèrement plus large (de 3,5 à 5,5 μ) et la paroi est plus épaisse (2 000 Å). Elle apparaît constituée de deux couches : la couche interne étant plus contrastée que la couche externe. Un réseau fibrillaire d'exopolysaccharides limite extérieurement la paroi. Le plasmalemme apparaît festonné et le cytoplasme vacuolisé renferme les différents systèmes membranaires : les mitochondries étant dans ces conditions culturales plus petites et à matrice plus dense aux électrons après coloration acétate d'uranyle-citrate de plomb.

Sur les coupes traitées par le complexe WGA-or colloïdal, nous constatons, sur micrographies d'hyphes cultivées en absence ou en présence de monensine, un marquage régulier, homogène au niveau de la paroi, plus dense en présence de l'ionophore. Aucun marquage n'est observé de façon significative au niveau du cytoplasme (Fig. 4,a-b-c). Enfin la spécificité du marquage est confirmée par les témoins : après inhibition avec le N-N'-N'' triacétylchitotriose aucun marquage n'étant noté (Fig. 4,d).

Composition chimique des fractions pariétales :

Le fractionnement est réalisé par traitement successifs aux alcalis et aux acides selon Mahadevan & Tatum (1965) et la composition de chaque fraction est déterminée après hydrolyse.

Quatre fractions sont obtenues à partir des parois purifiées (tableau 1) :

— une fraction F1 extraite par NaOH 2N, précipitée par l'éthanol. Après dialyse et lyophilisation, elle représente 20,21 % des parois témoins. En présence de monensine le

pourcentage de cette fraction, par rapport au poids total des parois lyophilisées, subit une diminution importante de 28,45 %.

- une fraction F2 acido-soluble, neutralisée et lyophilisée, qui représente 37,64 % des parois témoins et qui subit une diminution d'environ 8 % en présence de l'ionophore.

- une seconde extraction alcaline du résidu conduit à la fraction F3 ; la précipitation par l'éthanol de cet extrait aboutit à l'obtention d'une quantité de matériel représentant après dialyse et lyophilisation 21,23 % des parois normales. La présence de monensine ne modifie pas le pourcentage de cette fraction.

- une fraction F4 résistante aux traitements par les alcalis et les acides représente après dialyse et lyophilisation 21,27 % des parois témoins : la présence de la monensine entraînant une augmentation de cette fraction de 42 %.

La composition de ces différentes fractions a été analysée et les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2.

En se basant sur les résultats exprimés en pourcentage du poids de la fraction lyophilisée (%*), des parois non traitées par la monensine, la fraction F1 renferme essentiellement des oses neutres (38 %) et du phosphore (11 %) ; les fractions F2 et F3 des oses neutres (respectivement 9 % et 54 %) ; enfin dans la fraction F4 on trouve du phosphore (33 %), de la glucosamine (environ 20 %) et des acides aminés (environ 20 %). La présence de monensine n'entraîne pas de grandes variations.

Constituants	Fraction 1		Fraction 2		Fraction 3		Fraction 4		Total*	
	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine	témoin	Monensine
Oses neutres	38,40	37,5	9,10	10,60	53,60	37	11,15	17,87		
%**	2,76	5,42	1,43	3,67	11,38	6,82	2,17	5,40	24,94	21,31
Glucosamine	2,58	1,16	0,33	0,57	1,46	1,40	19,40	18,20		
%**	0,52	0,17	0,12	0,20	0,31	0,29	4,13	5,50		
Ac. aminés	2,10	3,11	3,10	3,09	4	4,60	19,52	11,60	5,08	6,36
%**	0,42	0,45	1,17	1,07	1,06	0,95	4,15	3,30	6,80	5,97
At. azotiques	2,47	1,64	1,56	1,21	4,64	-	0,60	2,20		
%**	0,50	0,53	0,58	0,42	0,99	-	0,15	0,82	2,23	1,27
Phosphore	10,94	11,83	1,65	1,53	4,76	1,64	35,29	29,60		
%**	2,21	1,71	0,62	0,53	1,01	0,34	7,08	8,94	10,92	11,52

NOTA : les résultats sont exprimés en pourcentage du poids de la fraction lyophilisée (%*) ou en pourcentage du poids des parois lyophilisées (%**)
Total* : pourcentage de constituants dans les parois totales

Tableau 2 : Variations de la compositions des différentes fractions extraites des parois de *B. cinerea*

Par contre les résultats exprimés en pourcentage du poids des parois lyophilisées (%**), montrent que, dans les parois témoins, les oses neutres se rencontrent au niveau des fractions F1 et F3 (respectivement 7,8 et 11,4 %), les oses aminés (4 %), les acides aminés (20 %) et le phosphore (33 %) dans la fraction F4. En présence de monensine, les proportions des différents monomères restent plus ou moins identiques dans les fractions F1, F2 et F3, alors que dans la fraction F4, on note, mis à part les acides aminés, une augmentation des différents constituants.

La précipitation éthanolique des fractions F1 et F3 extraites par la soude, laisse supposer qu'il s'agit de polysaccharides liés à des protéines. La fraction F4 est la partie chitine de la paroi : en effet on sait que le polymère de la n-acétylglucosamine se caractérise par son insolubilité dans les acides et les bases dilués. Enfin, concernant le phosphore présent en abondance dans les parois du *B. cinerea*, il subit une augmentation en présence de monensine.

Enfin, en même temps que nous avons vérifié la pureté des fractions, nous avons comparé leur aspect ultrastructural après ombrage rotatif au platine. Les micrographies choisies comme illustration représentent les parois totales ainsi que la fraction 4 (Fig. 4.e-f). N'ayant pas constaté de différences significatives entre les différentes fractions

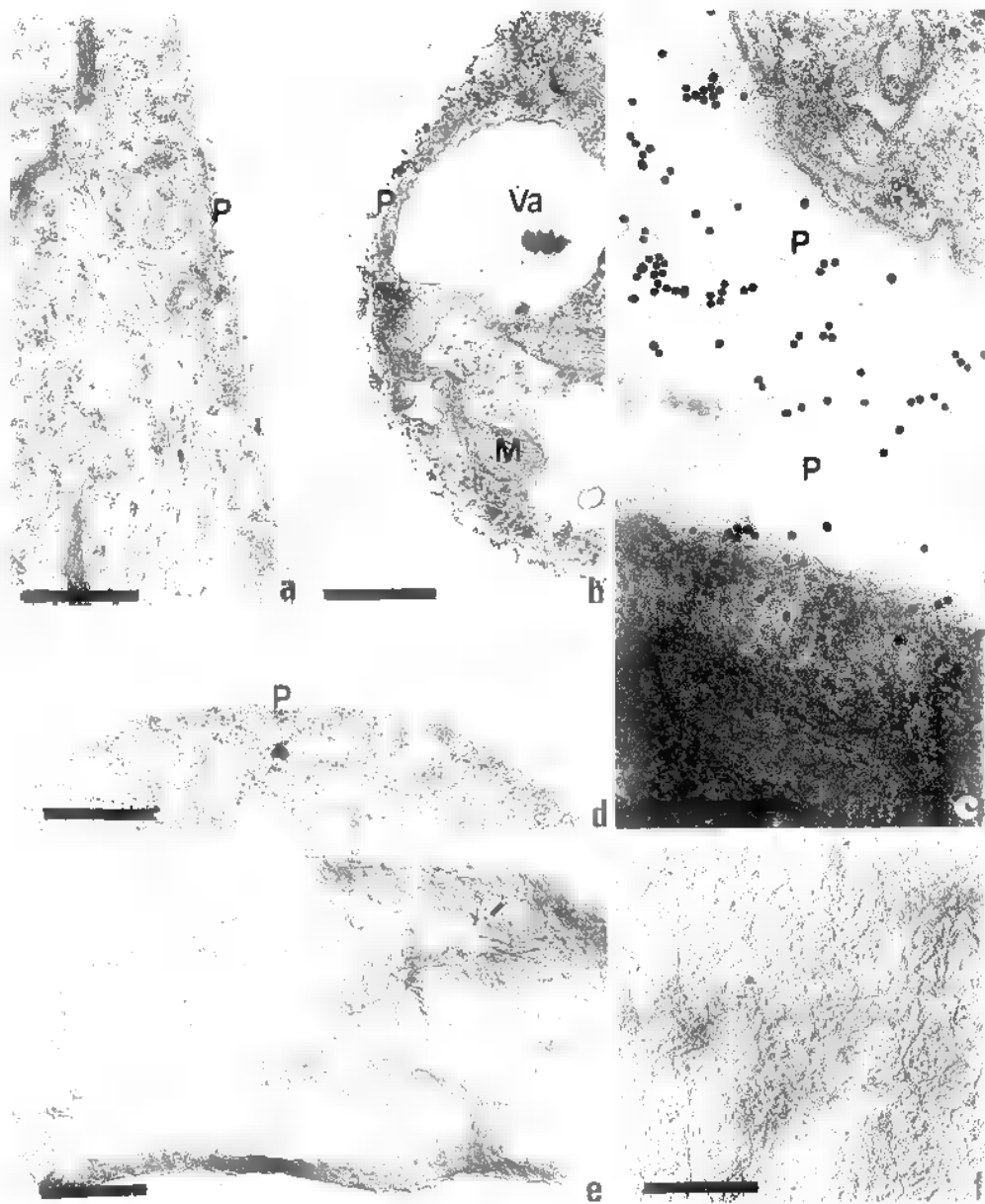


Fig. 4 a-d - Détection de la chitine par le marquage cytochimique WGA-or colloïdal : glutaraldéhyde-tétraoxyde d'osmium ; WGA-Au17 ; acétate d'uranyle-citrate de plomb ; e-f - Aspect morphologique des parois : ombrage rotatif au platine.

a - Parois (P) d'une hyphe non traitée par la monensine. Aucun marquage n'est observé de façon significative au niveau du cytoplasme : les grains étant localisés au niveau de la paroi. Echelle : 0,5 μ .

b-c - Parois (P) d'une hyphe traitée par la monensine. Nous notons une augmentation du marquage par rapport aux parois non traitées par l'ionophore. A comparer avec la Fig. 4.a. Echelle : b = 0,5 μ ; c = 0,25 μ .

e - Paroi (P) d'une hyphe non traité par la monensine, après inhibition avec le N-N'-N'' triacetylchitotriose. Aucun marquage n'est noté de façon significative, confirmant ainsi la spécificité du marquage. Echelle : 0,5 μ .

f - Aspect de parois totales obtenues à partir d'une culture témoin âgée de 5 jours. Echelle : 0,5 μ .

e - Aspect fibrillaire de la fraction F4 de parois obtenues à partir d'une culture se développant sur milieu témoin. Echelle : 0,5 μ .

pariétales témoin et expérience, nous ne donnerons pour illustration que les parois témoins. Les parois totales présentent un fond homogène granuleux dans lequel nous distinguons plus ou moins nettement des fibrilles enchevêtrées (Fig. 4,e) alors que la fraction F4 se caractérise par une texture fibrillaire plus nette correspondant aux fibres de chitine (Fig. 4,f).

DISCUSSION

Pour les temps d'exposition étudiés, la monensine à la concentration de 10 µg/ml n'a jamais eu un effet létal sur le *B. cinerea* : champignon filamenteux se caractérisant par un appareil de Golgi atypique. Elle inhibe sa croissance plus intensément en condition statique qu'en agitée : le pourcentage d'inhibition compris entre 93 et 100 % en culture statique, ne dépassant pas les 80 % en culture agitée (Koulali *et al.*, 1996a). Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs obtenus chez d'autres champignons appartenant à des groupes taxonomiques différents : cette diminution de la croissance pouvant résulter d'une inhibition de la synthèse des stérols (Wecte *et al.*, 1989). En outre, Pancaldi *et al.* (1994) constatent que la monensine provoque l'inhibition de la croissance chez la forme levure du *Candida albicans*. Dans des travaux précédents, nous avons montré que, chez l'*Achlya bisexualis*, le site d'action de la monensine est l'appareil de Golgi et que sa présence dans le milieu de culture a un impact négatif sur la composition et le fonctionnement des différents systèmes endomembranaires impliqués dans les processus sécrétoires, et donc dans les mécanismes de croissance (Koulali, 1992 ; Koulali *et al.*, 1996b).

L'examen comparatif en microscopie électronique de coupes en présence ou en absence de monensine fait apparaître des différences tant au niveau du complexe plasmalemme-paroi que des cytomembranes. En présence de monensine les parois apparaissent plus épaisses et le plasmalemme est fortement festonné, des structures lomasomiques lui étant associées. Concernant les systèmes endomembranaires, les variations s'observent au niveau de l'appareil vacuolaire plus important et des mitochondries plus petites et à matrice dense aux électrons. Ces observations ultrastructurales que nous avons réalisées sur l'influence de la monensine sur des zones apicales en croissance n'avaient à notre connaissance, jamais été entreprises sur des champignons filamenteux. Cependant, ces résultats peuvent être reliés à ceux obtenus par Poli *et al.* (1986) sur des blastospores de *Candida albicans* qui montrent que la monensine affecte la synthèse de la chitine et ainsi augmente l'épaisseur de la paroi. De leur côté, Sewall *et al.* (1986) ont constaté une vacuolisation importante lors de la formation des zoogamètes et des zoospores chez *Allomyces macrogynus*. De plus chez l'*Achlya bisexualis* nous avons montré que la monensine provoque des modifications au niveau des saccules golgiens qui gonflent puis se disloquent : les dictyosomes perdant leur aspect morphologique classique (Koulali, 1992). Enfin, en ce qui concerne les mitochondries nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mollenhauer *et al.* (1981, 1983, 1990), sur des cellules animales, puis Cunninghame & Hall (1986), Rudolph & Schnepf (1988) et Ciampolini *et al.* (1993), sur des cellules végétales, qui notent une altération des mitochondries accompagnée d'une matrice dense aux électrons.

Les parois du *B. cinerea* témoins (c'est à dire en absence de monensine) constituées en majorité par des oses neutres (25 %), se caractérisent aussi par la présence d'oses aminés (5 %), d'acides aminés (environ 7 %), de phosphore en quantité relativement élevée (environ 10 %) et d'acides uroniques en quantité peu importante ne dépassant pas les 2,5 %. Elles sont classées dans le groupe chitine-glucane (Bartnicki-Garcia, 1968). La présence de l'ionophore dans le milieu de culture n'entraîne que des variations quantitatives dans la proportion des différents monomères se traduisant par une importante diminution du rapport (oses neutres + acides uroniques)/oses aminés. Nous notons également une diminution des taux des acides aminés et une augmentation du phosphore inorganique.

Nos résultats concernant le fractionnement des parois témoins se rapprochent de ceux trouvés par d'autres auteurs. Chez les espèces de type chitine-glucane, la fraction F4, résistante aux traitements par les alcalis et les acides, représente toujours la partie chitine de la paroi. Ceci a été montré chez *Neurospora crassa* (Mahadevan & Tatum, 1965), *Aspergillus niger* (Johnston, 1965), *Mucor mucedo* (El Mougith *et al.*, 1988) et *Aspergillus fumigatus* (Hearn & Sietsma, 1994 ; Ghfir, 1995). Ces mêmes auteurs ont constaté que les autres fractions (non résistantes aux différents traitements), sont constituées en grande partie par des glucanes.

La présence de la monensine dans les milieux de culture se traduit par des variations au niveau de la composition chimique des différentes fractions pariétales. Dans la fraction 4, nous notons une augmentation des oses aminés (donc de chitine), confirmant nos résultats sur les parois totales (Koulali *et al.*, 1992). Cette augmentation qui a été aussi constatée par Poli *et al.* (1986), Pancaldi *et al.* (1994) chez *Candida albicans*, serait le résultat d'une perturbation de l'enzyme intervenant dans sa synthèse, la chitine synthétase : la monensine transforme la forme inactive de l'enzyme en forme active et en agissant sur le trafic vésiculaire, provoque un déséquilibre avec prédominance des facteurs activateurs sur les facteurs inhibiteurs. Il est possible que les modifications importantes du taux de Na⁺ et de K⁺ dans les cellules, conduit à l'activation des proenzymes par des mécanismes différents de ceux intervenant dans le trafic vésiculaire normal (Poli *et al.*, 1986).

La monensine provoque la diminution des oses neutres au niveau des fractions F1 et F3 (fractions riches en glucanes chez le témoin). Ce résultat corrobore les observations précédemment obtenus sur la composition globale des parois fongiques (Koulali *et al.*, 1992) et peut être mis en relation avec les travaux de Rudolph & Schnepf (1988) qui ont montré que chez *Fumaria hygrometrica* le nombre de rosettes impliquées dans la synthèse de la cellulose diminue très rapidement en présence de monensine. Moore *et al.* (1991), ont constaté que la monensine inhibe le transport de l'hémicellulose neutre vers la paroi. De leur côté, Zhang *et al.* (1993) dans une culture de sycamore constatent que la monensine inhibe la synthèse de la cellulose. Plus récemment, Satia-Jeunemaitre *et al.* (1994) ont montré que la biosynthèse et/ou la transformation des polysaccharides dans une culture cellulaire de sycamore sont affectés par l'ionophore. Enfin, Goubet *et al.* (1994) ont rapporté que chez le lin, la monensine induit une augmentation de l'activité de la glucane synthase II, par contre elle provoque la diminution de la glucane synthase I et de la galactane synthase, enzymes impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire.

La présence de monensine dans le milieu de culture provoque une diminution des acides aminés (donc de protéines) dans les différentes fractions pariétales, confirmant ainsi les résultats antérieurs obtenus aussi bien chez les champignons (Podila *et al.*, 1995) que chez les végétaux supérieurs. Melroy & Jones (1986) chez *Hordeum vulgare* et Sticher &

Jones (1988) chez *Zea mais* constatent une inhibition de la sécrétion de l'amylase en présence de la monensine.

Enfin, la monensine accroît fortement la quantité de phosphore dans la fraction 4. Nous n'avons pas recherché sous quelle forme le phosphore était présent dans ces parois, ni la nature des liaisons éventuelles avec les autres polymères. Datema *et al.* (1977) pensent qu'il s'agit de polyphosphates de poids moléculaire élevé. L'accroissement de leur proportion doit modifier la structure de cette fraction pariétale.

En conclusion, nous avons montré que la monensine a un effet inhibiteur sur la croissance fongique. Elle provoque des variations dans la composition chimiques des fractions pariétales fongiques. L'ensemble de ces modifications doit être mis en relation avec les changements qui se manifestent au niveau des dictyosomes et des phénomènes sécrétoires, comme cela a été observé chez d'autres espèces végétales (Shannon & Steer 1984 ; Rudolph & Schnepf 1988 ; Moore *et al.*, 1991) et chez des champignons à appareil de Golgi typique (Koulali, 1992). Une étude cinétique sur les variations provoquées par la monensine sur les dictyosomes est actuellement en cours.

BIBLIOGRAPHIE

- BARTNICKI-GARCIA S., 1968 — Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annual review of microbiology* 22 : 87-108.
- BLUMENKRANTZ N. & ASBOE-HANSEN G., 1973 — New method for quantitative determination of uronic acids. *Annals of biochemistry and experimental medicine* 54 : 484-489.
- BOUGHARIOS G., OSMAN J., BLACK C. & OLSEN I., 1994 — Excess matrix accumulation in scleroderma is caused partly by differential regulation of stromelysin and TIMP-1 synthesis. *Clinica chimica acta* 231 : 69-78.
- CABIB E., DURAN A. & BOWERS B., 1979 — Localized activation of chitin synthetase in the initiation of yeast septum formation. In : Fungal walls and hyphal growth. Burnett J. H. et Trinci A. P. J. ed., Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 189-201.
- CALZONI G. L., SPERANZA A., LI Y. Q., CIAMPOLINI F. & CRESTI M., 1993 — Wall biosynthesis and wall polysaccharide composition in pollen tubes of *Malus domestica* growing at low rate after monensin treatment. *Acta botanica neerlandica* 42 : 473-480.
- CIAMPOLINI F., LI Y. Q., CRESTI M., CALZONI G. L. & SPERANZA A., 1993 — Disorganization of dictyosomes by monensin treatment of in-vitro germinated pollen of *Malus domestica* Borkh. *Acta botanica neerlandica* 42 : 349-355.
- CUNNINGHAME M. E. & HALL J. L., 1986 — The effect of calcium antagonists and inhibitors of secretory processes on auxin-induced elongation and fine structure of *Pisum sativum* stem segments. *Protoplasma* 133 : 149-159.
- DARGENT R., 1977 — *Cytodifférenciation et croissance apicale chez les champignons filamenteux (Achlya bisexualis o, Mucor mucedo, Hypomyces chlorinus)*. Thèse Doctorat n° 766, Toulouse, France, pp. 187.
- DATEMA R., VAN DEN ENDE H. & WESSELS J. G. H., 1977 — The hyphal wall of *Mucor mucedo*. I. Polyanionic polymers. *European journal of biochemistry* 80 : 611-619.
- EL MOUGITH A., 1986 — *Influence de la cytochalasine A sur la morphogénèse du Mucor mucedo Linné : Conséquences cytologiques et biochimiques. Recherches sur le mode d'action de cette substance*. Thèse Doctorat d'Etat, n° 1271, Toulouse III, France, pp. 149.
- FONVIEILLE J.-L., RAZKI A., TOUZE-SOULET J.-M., DARGENT R. & RAMI J., 1991 — Effect of the monensin on the lipid composition of *Achlya bisexualis*. *Mycological research* 95 : 480-483.

- GEOGHEGAN W. D. & ACKERMAN G. A., 1977 — Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid, and anti-immunoglobulins to colloidal gold for the indirect detection of concavalin A, wheat germ agglutinin, and goat anti human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level. A new method, theory and application. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 25 : 1187-1200.
- GHFIR B., 1995 — *Activité antifongique de l'huile essentielle d'Hyssopus officinalis sur la croissance et la morphogénèse d'Aspergillus fumigatus (Fresenius) : conséquences cytologiques et biochimiques*. Thèse Doctorat de l'Université, n° 2060, Toulouse III, France, pp. 169.
- GOODAY G. W. & TRINCI A. P. G., 1980 — *Wall structure and biosynthesis in fungi*. In : The eukaryotic microbial cell, Gooday G. W., Lloyd D. et Trinci A. P. J. ed., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 207-251.
- GOODAY G. W., 1983 — *The hyphal tip*. In : Fungal differentiation. A contemporary synthesis, Smith J.E. ed., Marcel Dekker, Inc. New York & Basel. Vol. 4, pp. 315-356.
- GOUBET F., CHEKKAFI A., BRUYANT M. P. & MORVAN C., 1994 — Effects of monensin on cell wall metabolism of suspension-cultured flax cells. *Plant science* 97 : 161-168.
- HARRIS J. L. & TABER W. A., 1973 — Compositional studies on the cell walls of the synnema and vegetative hyphae of *Ceratocystis ulmi*. *Canadian journal of botany* 51 : 1147-1153.
- HEARN V. M. & SIETSMA J. H., 1994 — Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *Microbiology*, 140 : 789-795.
- HODGE J. E., & HOFREITER B. T., 1962 — *Determination of reducing sugars and carbohydrates*. In : Methods in carbohydrate chemistry, Whistler R. L. & Wolfrom M. L. ed., Academic Press, New York. Vol. 1, pp. 388-389.
- HOFFMANN-BENNING S., KLOMPARENS K. L. & KENDE H., 1994 — Characterization of growth-related osmiophilic particles in corn coleoptiles and deepwater rice internodes. *Annals of botany* 74 : 563-572.
- JOHNSTON I. R., 1965 — The composition of the cell wall of *Aspergillus niger*. *Biochemical journal* 96 : 651-658.
- KIMURA S., YAMADA M., IGAUE I. & MITSUI T., 1993 — Structure and function of the Golgi complex in rice cells — Characterization of Golgi membrane glycoproteins. *Plant and cell physiology* 34 : 855-863.
- KOULALI Y., 1992 — *Influence de la monensine sur la morphogénèse fongique : Conséquences cytologiques et biochimiques chez Achlya bisexualis o Coker*. Thèse Doctorat de l'Université, n° 1175, Toulouse III, France, pp. 169.
- KOULALI Y., FONVIEILLE J. L., TOUZE-SOULET J.-M., BENIZRI E. & DARGENT R., 1992 — Influence de monensine sur la composition des parois de quelques champignons filamenteux. *Canadian journal of microbiology* 38 : 277-283.
- KOULALI Y., TALOUIZTE A., FONVIEILLE J. L. & DARGENT R., 1996a — Influence de la monensine sur la croissance et la sécrétion des exopolysaccharides chez le *Botrytis cinerea* Pers. et le *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Canadian journal of microbiology* 42 : 965-972.
- KOULALI Y., FONVIEILLE J. L., & DARGENT R., 1996b — Influence of monensin on the composition of the plasmalemma of *Achlya bisexualis* o separated by freeze-flow electrophoresis. *Mycological research* 100 : 551-560.
- LIU C. M., 1982 — *Microbial aspects of polyether antibiotics. Activity, production, and biosynthesis*. In : Polyether antibiotics-Naturally Occurring Acid Ionophores, Westley, J. W. ed., Marcel Dekker, New York. Vol. 1, pp. 43-102.
- MAHADEVAN P. R. & TATUM E. L., 1965 — Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. *Journal of bacteriology* 90 : 1073-1081.
- MELROY D. & JONES R. L., 1986 — The effect of monensin on intracellular transport and secretion of β -amylase isoenzymes in barley aleurone. *Planta* 167 : 252-259.
- MOKRASCH L. C., 1954 — Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. *The journal of biological chemistry* 208 : 32-55.

- MOLLENHAUER H. H., ROWE L. D., CYSEWSKI S. J. & WITZEL D. A., 1981 — Ultrastructural observations in ponies after treatment with monensin. *American journal veterinary research* 42 : 35-40.
- MOLLENHAUER H. H., MORRE D. J. & ROWE L. D., 1983 — Monensin toxicity : an overview. *Texas society electron microscopic journal* 14 : 12-17.
- MOLLENHAUER H. H., MORRE D. J. & ROWE L. D., 1990 — Alteration of intracellular traffic by monensin : mechanis, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica et biophysica acta* 1031 : 225-246.
- MOORE P. J., SWORDS K. M. M., LYNCH M. A. & STAEHELIN L. A., 1991 - Spatial organization of the assembly pathways of glycoproteins and complex polysaccharides in the Golgi apparatus of plants. *The journal of cell biology* 112 : 589-602.
- MPONA-MINGA M., COULON J. & BONALY R., 1989 — Effects of subinhibitory dose of amphotericine B on cell wall biosynthesis in *Candida albicans*. *Research in microbiology* 140 : 95-106.
- PANCALDI S., BRUNI A., DALL'OLIO G. & FASULO M. P., 1994 — Interaction of monensin on dimorphic transition and hyphal growth in *Candida albicans*. *Microbios* 79 : 163-170.
- PODILA G.K., ROSEN E., SAN FRANCISCO M. J. D. & KOLATTUKUDY P. E., 1995 — Targeted secretion of cutinase in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 85 : 238-242.
- POLI F., PANCALDI S. & VANNINI G. L., 1986 — The effect of monensin on chitin synthesis in *Candida albicans* blastospores. *European journal of cell biology* 42 : 79-83.
- PRESSMAN B. C. & FAHIM M., 1982 — Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 22 : 465-490.
- PROSSER J. & TRINCI A. P. J., 1979 — A model for hyphal growth and branching. *Journal of general microbiology* 111 : 153-164.
- ROBERTS R. L., BOWERS B., SLATER M. L. & CABIB E., 1983 - Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cell biology* 3 : 922-930.
- RUDOLPH U. & SCHNEPF E., 1988 — Investigations of the turnover of the putative cellulose-synthesizing particle « rosettes » within the plasma membrane of *Fimaria hygrometrica* protonema cells. I - Effects of monensin and cytochalasin B. *Protoplasma* 143 : 63-73.
- SATIAT-JEUNEMAITRE B., FITCHETTE-LAINE A. C., ALABOUVETTE J., MARTY-MAZARS D., HAWES C., FAYE L. & MARTY F., 1994 — Differential effects of monensin on the plant secretory pathway. *Journal of experimental botany* 45 : 685-698.
- SEWALL T., OLSON L., LANGE L. & POMMERVILLE J., 1986 - The effect of monensin and gametogenesis and zoosporogenesis in the aquatic fungus, *Allomyces macrogynus*. *Protoplasma* 113 : 129-139.
- SHANNON T. M. & STEER M. W., 1984 — The root-cap system for the evaluation of golgi inhibitors. II — Effect of potential inhibitors on slime droplet formation and structure of the secretory system. *Journal of experimental botany* 35 : 1708-1714.
- SOMOGYI M., 1952 - Notes on sugar determination. *The journal of biological chemistry* 195 : 19-23.
- SPIES J. R., 1957 - *Colorimetric procedures for amino acids. II - Ninhydrin method*. In : *Methods in enzymology*. Colowick S. P. et Kaplan N. O. ed., Academic Press Inc., Publishers, New York. Vol. 3. pp. 468-471.
- STICHER L. & JONES R. L., 1988 — Monensin inhibits the secretion of α -amylase but not polysaccharide slime from seedling tissues of *Zea mays*. *Protoplasma* 142 : 36-45.
- THOMAS L., 1972 — *Etude de la fermentation aérobie du Botrytis cinerea (Pers). Croissance, morphologie, isolement, identification et production d'un (1-3) (1-6) glucane*. Thèse Doctorat 3e cycle n° 1283. Toulouse France.
- TRACEY M. V., 1955 - *Chitin*. In : *Modern methods of plant analysis*, Peach K. & Tracey M. V. ed., Springer-Verlag, Berlin. Vol. 2. pp. 264-274.

- WEETE J. D., EL MOUGITH A. & TOUZE-SOULET J.-M., 1989 — Inhibition of growth, lipid and sterol biosynthesis by monensin in fungi. *Experimental mycology* 13 : 85-94.
- WESSELS J. G. H., 1986 — Cell wall synthesis in apical hyphal growth. *International review of cytology* 104 : 37-79.
- ZHANG G. F., DRIOUICH A. & STAEHELIN A., 1993 — Effect of monensin on plant Golgi : re-examination of the monensin-induced changes in cisternal architecture and functional activities of the Golgi apparatus of sycamore suspension-cultured cells. *Journal of cell science* 104 : 819-831.

POPULATIONS OF FUNGI IN SOME RESERVOIRS IN SERBIA

Branislav RANKOVIĆ

Faculty of Science, University of Kragujevac, Yugoslavia

ABSTRACT : The paper presents results of mycological studies conducted in the three larger reservoirs in Serbia (Čelije, Grošnica and Gruža), which have different hydrological and production characteristics. These studies were conducted during all seasons of 1996. The quantitative analysis of fungal communities showed that the average number of their spores in these reservoirs was between 2000 and 4990 per liter of water. The highest number of spores was found in eutrophic reservoir of Gruža and the lowest identified in oligo-mesotrophic reservoir of Čelije. Number of spores was higher in the water samples taken near the bottom of the lakes and in littoral zone rich with macrovegetation, than in the middle water layers. In these reservoirs 45 species were identified out of 384 isolates. The most dominant genera were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Rhizopus* and *Verticillium*. The autochthonous aquatic fungal community was composed of the following species: *Achlya americana*, *Achlya racemosa*, *Catenaria sp.*, *Dictyuchus sterile*, *Pythium ultimum*, *Saprolegnia ferax*, *Saprolegnia hypogyna* and *Saprolegnia monica*.

KEY WORDS : allochthonous and autochthonous aquatic fungi, reservoir.

RÉSUMÉ : Le présent article résume les études mycologiques réalisées sur les trois plus importants réservoirs de Serbie (Čelije, Grošnica et Gruža), qui possèdent des caractéristiques hydrologiques différentes. Ces études ont été effectuées durant l'année 1996. Les analyses quantitatives des communautés fongiques indiquent que le nombre moyen de spores par litre d'eau est compris entre 2000 et 4990 ; la valeur la plus élevée correspondant au réservoir eutrophique de Gruža et la plus basse au réservoir oligo-mésotrophique de Čelije. Le nombre de spores est plus important dans les échantillons prélevés à proximité du fond du lac et dans la frange littorale riche en macrovégétation, que dans les prélèvements effectués en moyenne profondeur. Dans ces réservoirs 45 espèces ont été identifiées sur un total de 384 isolats. Les genres dominants sont : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Rhizopus* et *Verticillium*. La communauté fongique aquatique autochtone était constituée des espèces suivantes : *Achlya americana*, *Achlya racemosa*, *Catenaria sp.*, *Dictyuchus sterile*, *Pythium ultimum*, *Saprolegnia ferax*, *Saprolegnia hypogyna* et *Saprolegnia monica*.

MOTS CLÉS : champignons aquatiques allochtones et autochtones, réservoirs.

INTRODUCTION

Aquatic fungi play important role in the transformation processes of organic matter (Park, 1972a) in biohydroceneses. They affect the numbers of other hydrobionates (algae, protozoans, insects etc.) causing their epiphyticia and accumulation of dead

organic matter in ecosystem (Sen, 1988a, 1988b). They participate in destruction of autochthonous and allochthonous organic matter, providing food for some invertebrates and fish (Bärlocher, 1980, 1981) and also cause the water self-cleaning processes (Hynes *et al.*, 1974). The fungi have not been extensively studied in the aquatic ecosystems of Serbia (Ranković *et al.*, 1994; Vukojević & Franić-Mihajlović, 1994; Čomić *et al.*, 1995). The important role played by the aquatic fungi as structural and functional components of biohydroceneses, as well as the fact that their research in Serbia is just beginning, have motivated us to conduct these studies.

The studies were conducted in the three larger reservoirs in Serbia (Čelije, Grošnica and Gruža), which have different hydrological and production characteristics. These reservoirs belong to different classification types (Seleši, 1989; Martinović-Vitanović & Kačafatić, 1990; Ranković *et al.*, 1994). Accordingly, reservoir Čelije belongs to oligotrophic-mesotrophic type, reservoir Grošnica belongs to mesotrophic type and reservoir Gruža belongs to eutrophic type. The qualitative and quantitative composition of the allochthonous and autochthonous fungal communities, distribution of isolates obtained and seasonal dynamics were monitored in the period of study.

MATERIALS AND METHODS

During 1996, water samples were collected from the reservoirs during all seasons of the year (March-M, June-J, August-A, October-O) on 4-5 sites in the central parts of the reservoirs. The samples were taken from the layer near the bottom of the reservoirs (L1), middle layer (L2) in the central parts of the reservoirs and from the area near the shore which was full of plants at 20-30 cm depth (L3). Water samples were collected with a 2 liter Ruttner sampler. Water samples were processed during the same day of their collection using the dilution plate technique, adding 2 ml of water on Malt-agar culture medium in Petri dish with three repetitions. The quantity of fungal spores was determined by the number of the grown colonies. These were then isolated in pure cultures using standard mycological methods and replating on the selective culture media. All cultures were incubated at 25C (± 2) under day-night light exposure. Stock cultures are kept in the culture collection of the Faculty of Science, University of Kragujevac.

The autochthonous, aquatic fungi were studied by direct microscopic examination of the water and material collected by a baiting method with seeds of *Canabis sativa*, cellophane and nail pieces (Arnold, 1968). The isolated species were identified using following literature: Middleton (1943), Raper & Thom (1949), Cooke (1963), Raper & Fennel (1965), Coker (1969), Seymour (1969), Gilman (1971), Barnet & Hunter (1972), Batko (1975) etc.

CHARACTERISTICS OF RESERVOIRS

Čelije reservoir is located on the river Rasina, 30 km away from the city of Kruševac. Constructed in 1979, it has a drainage basin of 598 km² and the reservoir itself has a surface of 60 km², a volume of around 60×10^6 m³ and maximum depth of 40 m. The current purpose of Čelije reservoir is to supply only the city of Kruševac with drinking

water, however it will soon be used for the same purpose serving the neighbouring cities: Paraćin, Čuprija and Jagodina. Based on the level of primary organic production and analysis of plankton species as indicators of trophic conditions, it can be concluded that the lake belongs to the mesotrophic type (Seleši, 1989; Ranković *et al.*, 1992).

Grošnica lake was made in 1931 by building a dam on the Grošnica river, right affluent of Lepenica river. It is located in the vicinity of Kragujevac and is used for supplying this city with water. Initial volume of the lake was $1.7 \times 10^6 \text{ m}^3$. The dam height was increased by 7 m in 1962, thus increasing the lake volume to $3.1 \times 10^6 \text{ m}^3$. The total dam length is 138 m, and its height is 50 m. Based on the indicators of water trophic conditions, it can be concluded that the lake belongs to the mesotrophic type.

Gruža reservoir was constructed in 1983 by building a dam 26 m high in the middle part of the Gruža river drainage basin. Its basic purpose is to supply drinking water for Kragujevac, Kraljevo and surrounding places. The reservoir is located at an altitude of 238-269 m. Its total volume in the period of investigation was $64,6 \times 10^6 \text{ m}^3$ and the surface area was 934 ha. Gruža reservoir has a drainage basin of 318 km, and maximum depth of 31 m. Based on the level of primary organic production and analysis of plankton species as indicators of trophic conditions, it can be concluded that the lake belongs to the eutrophic type (Martinović-Vitanović & Kalafatic, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

Qualitative and quantitative composition of the fungal community

Having analyzed the fungal community density in the studied reservoirs during the first season, the following conclusions were reached (Tab. 1). Average number of spores in the water of different reservoirs varied significantly. Results of the statistical analysis show that the greatest average number of spores (4990 in one liter of water) was found in the eutrophic Gruža reservoir at the location (L3), and the lowest one (2000 in one liter of water) was found in the oligo-mesotrophic Čelije reservoir at the location (L2). The greatest quantity of spores was found in the coastal areas rich with macrophytes (L3). Number of spores in all reservoirs is higher in the lower water layers (near the bottom --- L1) than in the middle water layers in the central parts of the lakes (L2). Increase of the spore number at the lower water layers of the reservoirs (L1) is the result of flushing the sediments from the bottom. Very high number of spores was observed at the lower water layers of Gruža reservoir (L1), probably as a result of the fact that at the bottom of this reservoir there is a high quantity of silt rich with organic compounds, suitable for growth of some fungi.

By monitoring the seasonal dynamics of the number of spores, it can be observed that it is the highest in the water samples taken in March and October. This can lead to the assumption that the increased number of fungi in this period is related to atrophy of macrophytic vegetation as well as with inflow of soil fungi into the lakes in the period of stream torrents. Besides, in the fall and winter periods, due to greater and more frequent movements of water flows, higher number of fungi from the silty bottom of lakes can enter the free water flows. The highest number of spores was observed in March on all locations of the studied reservoirs (Tab. 2). The maximum average number of spores was found on the location (L3) of Gruža reservoir (8320 spores/l of water). The minimum

RESERVOIR	AVERAGE NUMBER OF SPORES/LITER OF WATER		
	L1	L2	L3
Ćelije	2700	2000	2400
Grošnica	3300	2250	4050
Gruža	4100	3700	4990

Table 1. Number of fungal spores in the water of reservoirs in Serbia

RESERVOIR	Sampling location	Average number of spores/one liter of water			
		MARCH	JUNE	AUGUST	OCTOBER
ĆELIJE	L ₁	4832	571	2195	3202
	L ₂	3218	251	2032	2499
	L ₃	3724	318	2840	2718
GROŠNICA	L ₁	6245	714	3166	3075
	L ₂	3712	418	1920	2887
	L ₃	6110	518	4219	5353
GRUŽA	L ₁	6917	495	3281	5707
	L ₂	5375	605	3747	5073
	L ₃	8320	619	4945	6076

Table 2. Seasonal dynamics of the number of spores in the water of reservoirs in Serbia

NO	FUNGAL SPECIES	ČELIJE			GROSNICA			GRUZA		
		L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1.	<i>Absidia spinosa</i> Lendn.								A	A
2.	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keiss.	J		JO	M	O		M		
3.	<i>Aspergillus amstelodami</i> (Mang) Thom et Ch.							M		M
4.	<i>Aspergillus candidus</i> Link ex Fr.	■		M			■			
5.	<i>Aspergillus flavus</i> Link ex Fr.	JA	A	A	AO	A	JA	A	A	A
6.	<i>Aspergillus fumigatus</i> Fres.			O	A			A		JA
7.	<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem		M					■		
8.	<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlburg) Cohn	O			M					
9.	<i>Aspergillus</i> sp.						■			
10.	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary)	A			A	O		AO		O
11.	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. ex Fr.	M			M		O	O		O
12.	<i>Candida albicans</i> (Robin) Berkhout							O		O
13.	<i>Cladidium chlamydosporis</i> Hughes							M		O
14.	<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fr.	■					M	A		
15.	<i>Cladosporium carpophilum</i> Thum.	O		O						
16.	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres) de Vries			M		J	A			A
17.	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers) Link ex Fr.				M	M	M	M		MJ
18.	<i>Cladosporium variabile</i> (Coke) de Vries				MO					
19.	<i>Cladosporium</i> sp.							M		M
20.	<i>Epicoccum purpurascens</i> Ehrenb. ex Schecht			AO	A	O	O	AO	A	AO
21.	<i>Fusarium aquaeductum</i> (Reb.) Sacc.							MJ	M	M
22.	<i>Fusarium heterosporum</i> Ness.	M		M			J			O
23.	<i>Fusarium moniliforme</i> Sheldon						M			
24.	<i>Fusarium sporotrichiella</i> Bilai							O	O	
25.	<i>Geotrichum candidum</i> Link	J					JA	J		J
26.	<i>Hansenula anomala</i> (Hansen) H. et P. Sydow	A	O	O			O			
27.	<i>Mortierella</i> sp.			A						
28.	<i>Mucor mucedo</i> L ex Fr.	MO	M	M	M	M	MO	M	M	MO
29.	<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	JA	J	M	M	MJ				
30.	<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier				M			M		MJ
31.	<i>Penicillium brevi-compactum</i> Dierex							MJ	J	J
32.	<i>Penicillium citrinum</i> Thom	A		A						
33.	<i>Penicillium cyclopium</i> Zukal	A		A	A	A	JA	A	JA	JA
34.	<i>Penicillium expansum</i> Link									A
35.	<i>Penicillium funiculosum</i> Thom						MJ	MJ	J	JA
36.	<i>Penicillium thomii</i> Maire						A			■
37.	<i>Penicillium verucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (West.) Samson	AO	O	O	A		A	AO	AO	O
38.	<i>Phoma herbarum</i> West.			A	A		O			
39.	<i>Phoma</i> sp.	M			M	O		M	■	MJ
40.	<i>Rhizopus nigricans</i> Ehr.	JA						A		
41.	<i>Trichoderma virida</i> Pers. ex S. F. Gray							O		
42.	<i>Trichoderma</i> sp.				M			■		
43.	<i>Verticillium lateritium</i> Berk.				AO			A		O
44.	<i>Verticillium fenerum</i> (Nees:Pers) Link				O			M		
45.	<i>Verticillium</i> sp.				M					

■ = Sampling period - M = March; J = June; A = August; O = October

■ L1, L2, L3 are water samples taken from different water layers (see "Material and methods").

Table 3. The composition and dynamics of fungal communities in reservoirs in Serbia

NO	FUNGAL SPECIES	ĆELIJE			GROŠNICA			GRUŽA		
		RESERVOIR			RESERVOIR			RESERVOIR		
		L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3
1.	<i>Achlya americana</i> Humph.			AO		A	JA	MJ	MJ	AO
2.	<i>Achlya racemosa</i> Hild.					J				M
3.	<i>Catenaria</i> sp.									J
4.	<i>Dictyuchus sterile</i> Coker	MJ	JA	JA	MJ	JA	AO	AO	MJ	MJA O
5.	<i>Pythium ultimum</i> Trow	A	JA	A	MJ	J	O	O	AO	AO
6.	<i>Saprolegnia ferax</i> (Gguith) Thuret			M						M
7.	<i>Saprolegnia hypogyna</i> Pringsh.			A			AO		A	AO
8.	<i>Saprolegnia monica</i> Pringsh.						A			AO

Note:

- Sampling period - M = March; J = June; A = August; O = October
- L1, L2, L3 are water samples taken from different water layers (see "Material and methods").

Table 4. The composition and dynamics of autochthonous aquatic fungal communities in reservoirs in Serbia

average number of spores was recorded in June in all reservoirs, while the lowest one was found on the location (L2) Ćelije reservoir (251 spores/l of water). Seasonal dynamics of fungi was most prominent in the water samples taken from Gruža reservoir.

Qualitative composition of species is shown in Tab. 3. In the water samples taken from these reservoirs, 45 species were identified out of 384 isolates. It should be observed that most of them are found rarely or only once and that only representatives of some genera had a relatively high degree of mass presence. These fungi primarily belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. They are dominant in all investigations of studied reservoirs. Besides, the following genera of fungi are also frequently found: *Cladosporium*, *Fusarium*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Mucor* and *Verticillium*. High resemblance in the fungal species composition was previously found in Skadar lake (Ristanović, 1973), where species of genus *Penicillium* were dominant, as well as in the water of Vlasina lake (Vukojević *et al.*, 1994).

Number of fungal species in the water samples taken from the studied reservoirs does not vary greatly. The greatest number of species was found in Gruža reservoir (33)

while the lowest number of species was found in Čelije reservoir (24), which can be related to the trophic condition of reservoirs.

Fungi isolated from the water samples taken from the reservoirs were in conformance with ecological classification of aquatic heterotrophic microorganisms (Park, 1972a) and they belong to the category of transitional, accidental microorganisms and probably migrants. The latter are characterized by periodic and sporadic activity. Transitional and accidental organisms can develop sporadic activity or have a lack of it. Park (1972b) indicates the possibility of the soil fungi participation in microbiological processes in waters. Besides, living capacity of some soil fungi (species of genera *Fusarium*, *Botrytis* and *Chaetomium*) in sea and river water was experimentally proven (Alton, 1985). Thus, depending on the trophic conditions of the lake, along with the typical aquatic (autochthonous) fungi, the soil fungi can also participate in the microbiological processes present in the lake ecosystems.

Qualitative composition of the autochthonous fungal community

Out of biphlagelatic series of this group of fungi, this paper included 8 species which belong to the Saprolegniales and Peronosporales orders. The distribution results related to this group of microorganisms are given below (Tab. 4).

Most of the identified species belong to the order Saprolegniales and the dominant genera are *Achlya* and *Saprolegnia*. These species were isolated from most of the samples taken in the studied reservoirs. They were also found as dominant in the waters of American lake Blelham Tarn (Dick, 1966) and Skadar lake in Macedonia (Ristanovic, 1973). The highest number of species (8) was identified in Gruža reservoir, while the lowest number (5) was found in Čelije reservoir, indicating that the trophic conditions of the reservoir probably affects the number of these fungi. The significant number of samples contained fungi belonging to the genera *Dictyuchus* and *Pythium*, while *Catenaria sp.* was located only in one sample taken from Gruža reservoir. By monitoring the seasonal dynamics, no regularity in fungal distribution in the studied reservoirs was found. In general, sporadic nature of the aquatic fungi distribution was prominent in some parts of the reservoirs, with their more significant presence in the coastal parts rich in macrovegetation.

Mycological studies of reservoirs are important both from the mycological and ecological aspects, since presence of certain species can be the indicator of the water quality level.

REFERENCES

- ALTON L. V., 1985 — Survival of some *Fusarium* species in sea and river water. *Mycol. Phytopathol.* 19, 3: 193-199.
- ARNOLD G. R., 1968 — Methods of collection and studying fresh water hyphomycetes. *Mycol. Phytopathol.* 2: 158-160.
- BÄRLOCHER F., 1980 — Leaf-eating invertebrates as competitors of aquatic hyphomycetes. *Oecologia* 47: 303-306.
- BÄRLOCHER F., 1981 — Fungi of the food and in the faeces of *Gammarus pulex*. *Transactions of the british mycological society* 76: 160-165.

- BARNETT H. & HUNTER B., 1972 — *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Publ. Co Minneapolis, 241 p.
- BATKO A., 1975 — *Zarys hydromikologii*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa, 417 p.
- COKER W. C. 1969 — *The Saprolegniaceae*. The University of North Carolina Press, 201 p.
- COOKE B. W., 1963 — *A laboratory guide to fungi in polluted water, sewage, and sewage treatments system*. Public Health Service. Publication 999-WP-1, 132 p.
- ČOMIĆ L. J., RANKOVIĆ B. & BARBIĆ F., 1996 — Fungi in Gruža reservoir. *Archiv für hydrobiologie. Spec. Issued Advanc. Limnol.* 48: 105-111.
- DICK W. M., 1966 — The Saprolegniaceae of the Environ of Blelham Tarn: Sampling Techniques and Estimation of Propagule Numbers. *Journal of general microbiology* 42: 257-282.
- GILMAN I. S., 1971 — *Soil Fungi*. The Iowa State Univ. Press. USA, 450 p.
- HYNES H. B. N., KAUSHIK N. R. & LOCK M. A. 1974 — Benthos and allochthonous organic matter in stream. *Journal of the fisheries research board of Canada* 31, 5: 545-553.
- MARTINOVIĆ V. & KALAFATIĆ V., 1990 — Classification of some reservoirs in SR Serbia (SFR Yugoslavia) based on analysis of plancton species as indicators of trophic conditions. *Archiv für Hydrobiologie Beihefte., Ergebn. Limnol.* 33: 381-387.
- MIDDLETON J., 1943 — *The taxonomy, host range and geographic distribution of the genus Pythium*. Memoirs of the Torrey Botanical Club, Lancaster, 171p.
- PARK D., 1972a — Methods of detecting fungi in organic detritus in water. *Transactions of the british mycological society* 58, 2: 281-290.
- PARK D., 1972b — On ecology of heterotrophic micro-organisms in fresh-water. *Transactions of the british mycological society* 58(2): 291-299.
- RANKOVIĆ B., ČOMIĆ L. J. & SIMIĆ S., 1992 — *Fitoplankton akumulacionog jezera Čelije*. Konferencija Zaštita voda 92. Zbornik radova : 90-95.
- RANKOVIĆ B., ČOMIĆ L. J. & SIMIĆ S., 1994 — *Populacija gljiva u akumulacionom jezeru Gruža*. Konferencija Zaštita voda 94. Zbornik radova: 110 — 116.
- RAPER K. B. & THOM C., 1949 — *A manual of the Penicillia*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 875 p.
- RAPER K. B. & FENNEL D. I., 1965 — *The genus Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, 875 p.
- RISTANOVIĆ B., 1973 — The population of fungi in Skadar Lake with Special emphasis on aquatic phycomycetes. *Mikrobiologija* 10(1): 53-61.
- SELEŠI D., SIMIĆ D. & LEHOČKI I., 1989 — *Nutritivjeni elementi u akumulaciji Čelije u blizini Kruševca*. Konferencija Zaštita voda 89. Zbornik radova: 98-107.
- SEN B., 1988a — Fungal parasitism of planktonic algae in Shearwater III. Fungal parasites of diatoms. *Archiv für Hydrobiologie, Suppl.* 79(2-3): 167-175.
- SEN B., 1988b — Fungal parasitism on planktonic algae in Shearwater V. Fungal parasites of the green algae. *Archiv für Hydrobiologie, Suppl.* 79(2-3): 185-205.
- VUKOJEVIĆ J. & FRANIĆ-MIHAJLOVIĆ D., 1994 — *Mikopopulacija Vlasinskog jezera i slivnog područja*. Konferencija Zaštita voda 94. Zbornik radova: 210-214.
- SEYOMOUR R. I., 1969 — *The genus Saprolegnia*. Beihefte zur nova hedwigia, 124 p.

A NEW *LACTARIUS* SPECIES FROM SCANDINAVIA IN THE SECTION *DAPETES*

Annemieke VERBEKEN¹ and Jan VESTERHOLT²

¹ Univ. Gent, Vakgroep Biologie — Lab. Plantkunde
Ledeganckstraat 35 — B-9000 Gent — Belgium
e-mail: mieke.verbeken@rug.ac.be

² Botanical Museum — Gothersgade 130 — DK-1123 — Denmark

RÉSUMÉ: *Lactarius fennoscandicus* nov. sp. est décrite de Suède et de Finlande dans la section *Dapetes*. Cette espèce, mycorrhizique avec *Picea*, est caractérisée par un chapeau habituellement fortement zoné, avec des nuances lilas-gris mélangées d'une couleur brun-orange, par endroits verdâtre, par le latex vivement orange, changeant tardivement en rougeâtre et par les spores nettement petites.

MOTS CLÉS: *Lactarius fennoscandicus* nov. sp., section *Dapetes*, ectomycorhize, *Picea*, Scandinavie.

ABSTRACT: *Lactarius fennoscandicus* nov. sp. is described from Sweden and Finland as a *Picea*-associated member of the section *Dapetes*, characterized by a usually strongly zonate cap, with lilac greyish tinges mixed with brownish orange, and locally greenish, by a bright orange milk which is slowly reddening and by remarkably small spores.

KEY WORDS: *Lactarius fennoscandicus* nov. sp., section *Dapetes*, ectomyrrhiza, *Picea*, Scandinavia.

DESCRIPTION

Lactarius fennoscandicus Verbeken & Vesterholt, nov. sp.

L. deterrimus affinis, a quo imprimis differt pileo saepe valde zonato umbra lilacino-griseaque, sporis parvioribus (7.5-8.0 × 6.0-6.5 μm) et cheilocystidiis rarioribus parvioribusque. Holotypus: Sweden. Siljanfors, in rich mixed forest, under *Picea*, acid soil, with *Sphagnum* and *Vaccinium*, 31.08.97, leg. Morten Christensen, Verbeken 97-530 (holotype GENT, isotypus C).

Pileus 32-80 mm diam., convex and very slightly depressed to infundibuliform; margin bent downwards; surface greasy, sticky, slightly viscid, strongly and densely zonate, especially in older specimens, with 4-5 broad zones composed of watery spots at the outside and some smaller zones at the inside, besides some very narrow and dense

zones at the extreme margin; center and inner zones brownish vinaceous (8E4) to dark brick-coloured (8E5) or cinnamon (6CD6); zones further out fawn (7E5) to clay-buff (6D4-5), greyish brown (6E4) or paler, sometimes more olivaceous, between the zones greyish pink (6B2) to greyish pink (6B3-4), or clay-buff (5C3-4, 6C3-4), locally green to blueish green and with a greyish lilac tinge as a whole. Stipe 40-110 × 10-24 mm, cylindrical to subclavate, broader near the base; surface dry, soft, slightly pruinose, cotton-like, dull, pale salmon (6A2) to salmon (6A3), pinkish buff (5A3), saffron (5A5-6), greyish brown (6D3) or clay buff (5C4), sometimes whitish at extreme apex, sometimes with some ochraceous orange or dirty green spots or scrobicules. Lamellae decurrent, medium crowded to rather crowded, with a lot of short lamellulae, fragile, thin, paper-like, saffron (5A6) to peach (6A6) or ochraceous orange (6B7), turning greyish green (26E5-6) when bruised; edge entire, ochraceous (5B7). Context moderately firm to rather soft, hollow in the stipe, white to (pale) cream-coloured (4A2-3), ochraceous orange near the stipitipellis (6B7), with a central whitish part, sometimes changing to blueish green (23-24C4) under the pileipellis, not reacting with KOH, SF and FeSO₄; smell not particular, sometimes reminding carrots; taste first mild but then bitter and bad, sometimes only slightly bitter and a bit carrot-like. Latex rather scarce, bright orange, carrot, changing to green, then dirty, dark greenish grey.

Spores [80.4] ellipsoid, sometimes subglobose, 6.8-7.5-8.1-9.3 × 5.6-6.1-6.5-7.0 μm. Q = 1.11-1.22-1.26-1.38; ornamentation composed of narrow ridges and some rounded warts, forming an incomplete reticulum; ridges sometimes composed of separately visible warts; plage not or weakly distally amyloid. Basidia 42-50(60) × 10-11 μm, subcylindrical to subclavate, 4-spored. Pseudopleurocystidia very abundant, mostly not emergent, often branching and irregularly shaped, 2-5 μm diam. Macropleurocystidia extremely rare, 50-55 × 7-8 μm, subfusiform, with narrowing or moniliform apex, with needle-like content, thin-walled. Lamella-edge sterile with rare cheilocystidia; marginal cells 8-15 × 4-6 μm, subclavate or subcylindrical, hyaline and thin-walled; cheilocystidia 15-25 × 4-6 μm, subfusiform to fusiform, with acutely tapering apex, with needle-like content, thin-walled. Pileipellis an ixocutis, about 50-100 μm thick, composed of rather thin (2-4 μm diam.) hyphae, which are shrinkled and gelatinizing in the upper layer. The description is based on Heilmann-Clausen 97-119, 97-183, Verbeken 97-530 and Vesterholt 95-330 (colour codes after Kornerup & Wanscher, 1978).

Examined material and distribution

Sweden. Dalarna, Siljanfors S of Mora, in rich mixed forest, under *Picea*, acid soil, with *Sphagnum* and *Vaccinium*, 31.08.97, leg. Morten Christensen, Verbeken 97-530 (holotype GENT, isotypus C) and Heilmann-Clausen 97-119 (C, GENT). Jämtland, Fors par., Reva, at Indalsälven, 23.08.95, Vesterholt 95-330 (C, GENT). Jämtland, Bräcke, Gimån, in moist forest with mosses under *Picea*, 05.09.1997, Heilmann-Clausen 97-183 (C, GENT).

Finland. Pohjois-Häme, Aänekoski, Parantala, 21-08-86, Vesterholt 86-482 (C).

Hitherto only known from Sweden and Finland but probably more widespread in subboreal and boreal forests.

DISCUSSION

Prospecting the Scandinavian woods, one is immediately struck by the enormous macroscopic variety observed in milkcaps of the section *Dapetes* Fr. growing with *Picea*, as illustrated by Korhonen (1984, sub *L. deterrimus* Gröger). Some of these have caps which are more zonate and more lilac greyish than we know them to be in the typical *L. deterrimus* collections from central Europe. These differently coloured Nordic collections showed to have clearly different spores than those of *L. deterrimus*, and are proposed here as a new species as no other taxon could be traced matching the characters described here. We do not exclude, however, that besides those two *Picea*-associates, more undescribed species of this group occur in the Nordic *Picea*-forests.

Lactarius deterrimus and *L. fennoscandicus* are the only two European *Dapetes*, up to now known, growing with *Picea*. Both species seem closely related but *Lactarius fennoscandicus* is more obviously zonate while *L. deterrimus* is often totally azonate or only zonate near the margin. A greyish lilac shade all over the cap with some clearly lilac tinged zoned is typical for *Lactarius fennoscandicus*, while *L. deterrimus* has a major orange cap. It should be noted that cap — and stipe-colour are variable characters in both species, varying strongly also depending on the age of the basidiocarps. Macroscopically, it reminds also some forms of *Lactarius quieticolor* Romagn. (syn.: *L. hemicyaneus* Romagn., *L. pinastri* Romagn.). Only the microscopy can provide decisive answer (figs. 1-2): the spores in *L. fennoscandicus* (average $7.5\text{-}8.0 \times 6.0\text{-}6.5 \mu\text{m}$) are clearly smaller than those from *L. deterrimus* (average $9.5 \times 7.5 \mu\text{m}$). Cheilocystidia almost completely lack in *Lactarius fennoscandicus* while they are moderately abundant in *L. deterrimus*. The few cheilocystidia observed in *L. fennoscandicus* are distinctly smaller than in *L. deterrimus*. *Lactarius sanguineovirescens* Fillion has similar (but slightly larger) spores as *L. fennoscandicus*, but differs by the context which is changing scarlet after 5 minutes and purple after 15 minutes. Furthermore, the species is growing on acid soils, associated with *Pinus* (Fillion, 1989).

Because in many descriptions of *Dapetes*-taxa the distinctive characters of closely related taxa are not emphasized and because an illustrated comparison of the spores, which is often their visiting-card, is lacking, we provide here spore-drawings of the accepted taxa in northern and western Europe (fig. 2a-h).

A coloured photograph of *Lactarius fennoscandicus* will be published in *Fungi of Northern Europe*, vol. 2 (in prep.). Some plates of *Lactarius deterrimus* given by Korhonen (1984: 108-109; labelled 2758, 4882) most probably refer also to the species described here.

REFERENCES

- FILLION R., 1989 — Un nouveau Lactaire du groupe *Dapetes* découvert dans la région de Clarafond. *Lactarius sanguineovirescens* nov. sp. *Bulletin de la Fédération Mycologique de Dauphiné-Savoie* 113: 21-22.
- KORHONEN M., 1984 — *Suomen rouskut*. Helsinki, Otava, 223 p.
- KORNERUP A. & WANSCHER J.H., 1978 — *Methuen handbook of colour*. London, Eyre Methuen, 252 p.

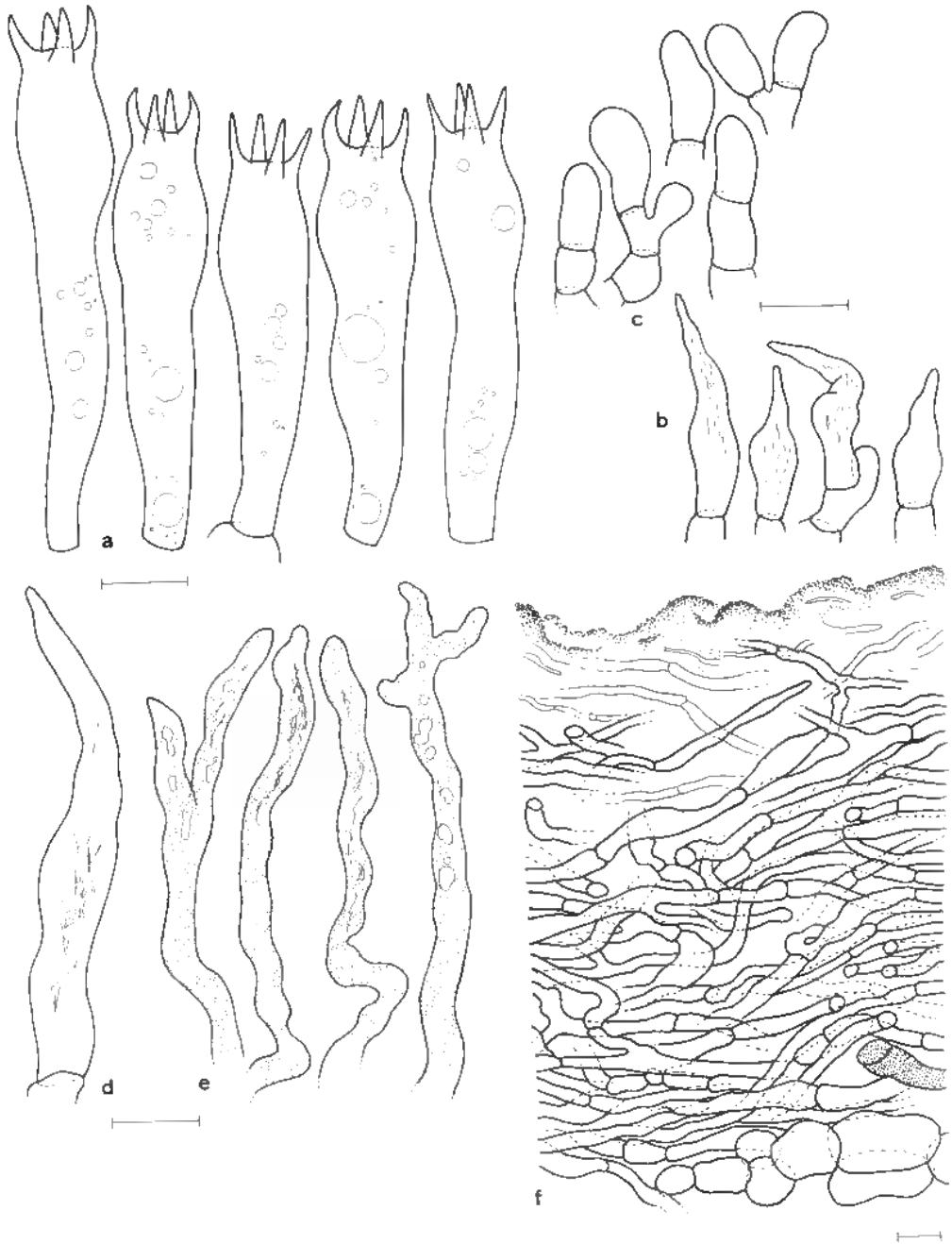


Fig. 1. *Lactarius fennoscandicus*. a. basidia, b. macrocheilocystidia, c. marginal cells, d. macropleurocystidium, e. pseudopleurocystidia, f. section through the pileipellis, halfway the radius (all from type; bar = 10 μ m).

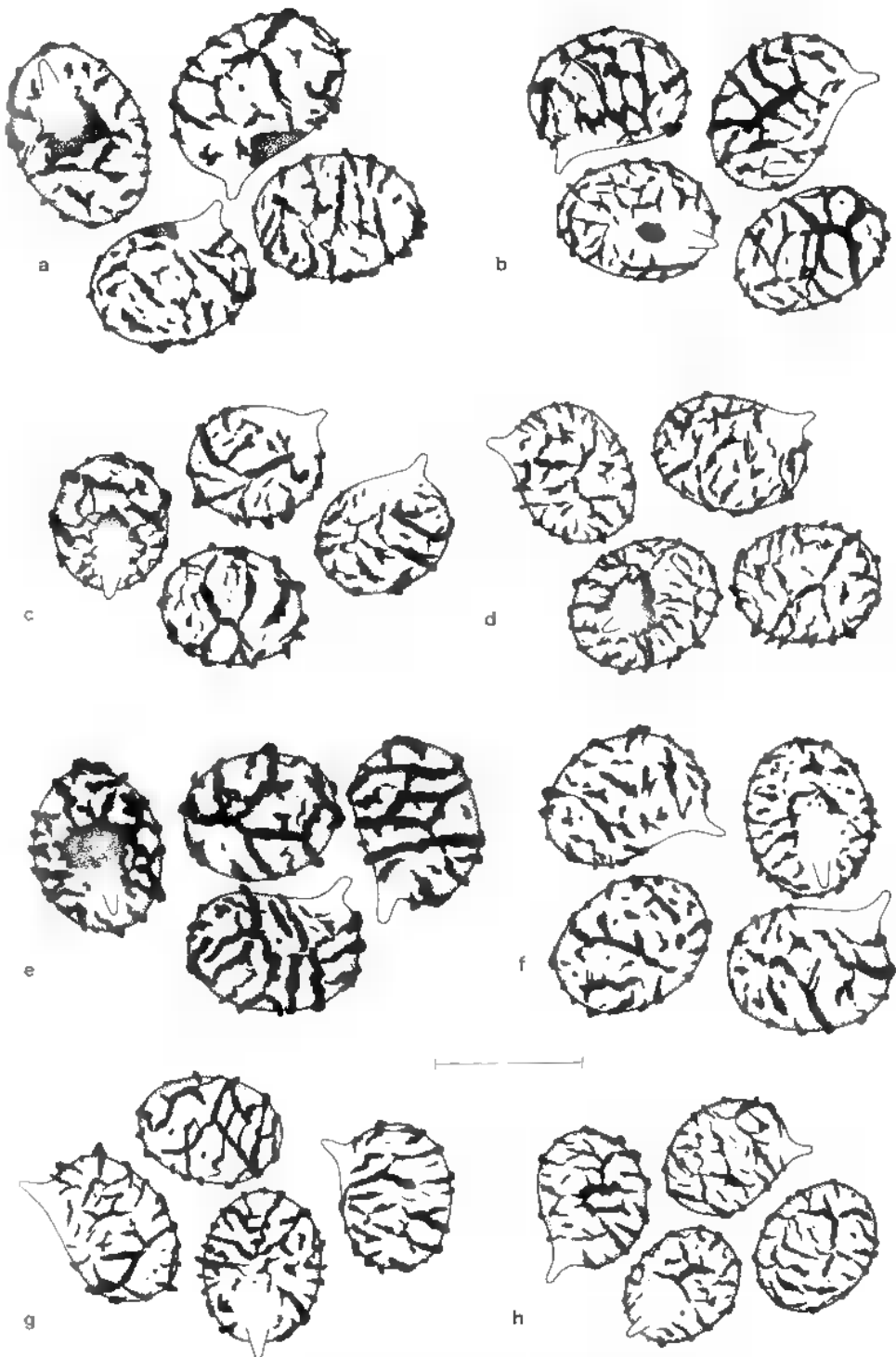


Fig. 2. Spores. a. *Lactarius salmonicolor* (Walley 570), b. *L. deliciosus* (Van de Kerckhove 330), c. *L. sanguifluus* (Walley 555), d. *L. semisanguifluus* (type), e. *L. quieticolor* (Walley 425), f. *L. deterrimus* (Verbeken 93-65), g. *L. sanguineovirescens* (isotype), h. *L. fennoscandicus* (type).

THE GENUS *ALEUROCYSTIS*

LEIF RYVARDEN

Botany Department, University of Oslo
P.O. Box 1045, Blindern
N-0314 OSLO, NORWAY

ABSTRACT: The genus *Aleurocystis* is discussed and the two accepted species are described and illustrated.

KEY WORDS: *Aleurocystis*, Basidiomycetes, Corticiaceae.

RÉSUMÉ: Le genre *Aleurocystis* est discuté et les deux espèces connues sont décrites et illustrées.

MOTS CLÉS: *Aleurocystis*, Basidiomycetes, Corticiaceae.

INTRODUCTION

During work with a synopsis of the genus *Aleurodiscus* (Nunez & Ryvarden, 1997), the name *Aleurocystis* G. Cunn. several times were mentioned in connection with the definition or delimitation of *Aleurodiscus* J. Schroet. A search in the literature revealed that there never had been a comprehensive treatment of species, correctly or wrongly, assigned to *Aleurocystis*. Thus, it seemed desirable to give a survey of this highly characteristic tropical genus, especially since the almost complete lack of manuals for corticioid fungi is a severe restriction for closer studies of these fungi.

***ALEUROCYSTIS* G. Cunn.**
Trans. Roy. Soc. New Zeal. 84: 234, 1956.

Basidiocarp cupulate to resupinate, pale yellow to ocher, annual, gelatinous and tough when fresh, horny and dense when dry, hyphal system monomitic, generative hyphae with clamps, thick-walled in the subiculum and straight to branched, gelatinized in KOH, basidia clavate with 4 sterigmata, metuloid cystidia present, thick-walled, encrusted at least in the upper part, in age also in lower part and more elongated, projecting to enclosed in old basidial layers, paraphysoid hyphae in some cases coming close to dendrohyphidia present in the hymenium, unbranched to slight branched, basidiospores smooth, large, thin-walled and non-amyloid, on dead hardwoods, two species, one pan-tropical, the other tropical America.

Type species: *Aleurodiscus capensis* Lloyd.

Remarks: The genus is probably not related to *Aleurodiscus*, but specimens are frequently collected and determined as belonging to that genus because of the discoid, scutellate basidiocarp with large basidiospores. The non-amyloid basidiospores and the metuloids will however, immediately exclude it from *Aleurodiscus* where such characters are unknown.

It may be that the genus is related to *Cytidia* and similar genera with which it shares the same type of semigelatinous cupulate basidiocarps and large basidiospores even if this of course may be a result of convergence. It is well known that basidiomycetes that produce basidiocarps in exposed environments as still attached dry branches, have large basidiospores (Ryvarden, 1991). The reason for this is unknown, but as the phenomena occur in several distant groups, it must have an adaptive value. The metuloid cystidia in *Aleurocystis* will however separate the genus from *Cytidia* Quel. and *Auriculariopsis* (Lev.) Maire species of which are rather similar to *Aleurocystis* species in the field.

Whether such metuloid cystidia indicate a different origin from that of the other genera, is debatable as there are many corticioid genera where such organs occur without being taken into account in the definition of the genus. Good examples are *Gloeocystidium* Donk, *Hyphoderma* Wallroth, *Peniophora* Cooke and *Phlebia* Fr. In these genera presence or absence of thick-walled metuloid cystidia are only used as a practical and pragmatic tool for separation of species.

KEY TO SPECIES

1. Pantropical species, dendrohyphidia present, spores subglobose, 18-22 × 15-17 µm *A. hakgallae*
1. American species, dendrohyphidia absent, spores oblong ellipsoid, 20-25 × 12-14 µm. *A. magnispora*

Aleurocystis hakgallae (Berk. & Broome) G. Cunn. Fig. 1

Trans. Roy. Soc. New Zeal. 84: 235, 1956.

Corticium hakgallae Berk. & Broome, J. Linn. Soc. 14: 72, 1873.

Cytidia cornea Lloyd, Lloyd Mycol. Notes. 47: 656, 1917.

Aleurodiscus capensis Lloyd, Lloyd Mycol. Notes 62: 930, 1920.

Basidiocarps annual, cupulate to discoid, separable, gelatinous and waxy when fresh, horn to cartilaginous and dense when dry, margin curled and turned inward when dry, slightly lifted when fresh, abhymenial surface smooth or with a few scattered hyaline hairs, hymenial surface pale yellow becoming whiter by age, smooth, hymenial layers deep and continuous, sterile subiculum thin and white.

Conidial stage cupulate to disciform, 2-7 mm in diameter, dorsally attached, lower surface smooth, pale buff to tan or slightly tuberculate, margin distinct and raised, outer surface cream to tan, finely tomentose, context dense to cream with numerous groups of condiospores, globose, thick-walled, smooth, non-amyloid, walls up to 3 µm thick, 17-20 µm in diameter.

Hyphal system monomitic; generative hyphae with clamps, thin-walled in the subhymenium, but rapidly gelatinized in KOH and difficult to separate in sections, richly branched, 4-8 µm wide, in the subiculum thick-walled and branched, 3-10 µm wide in the subiculum.

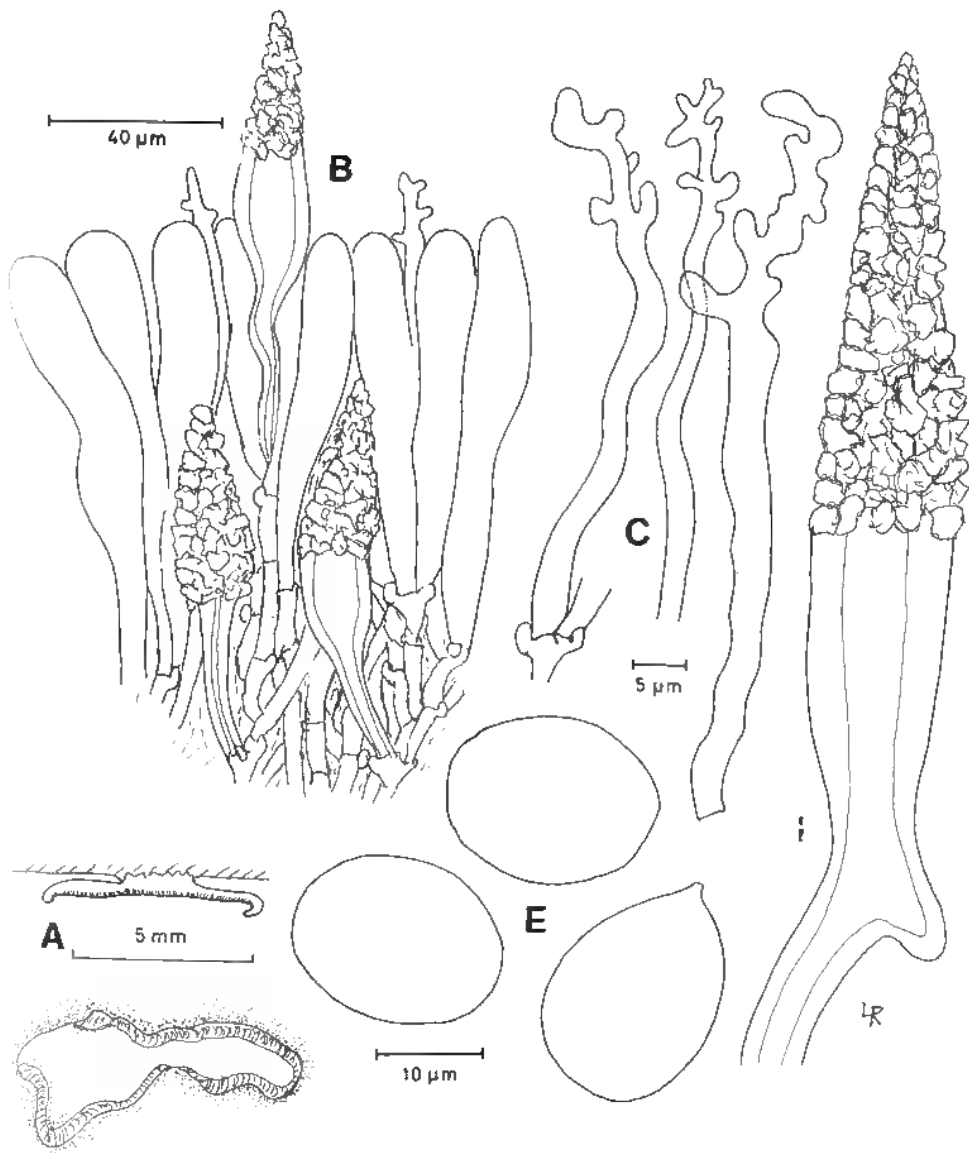


Fig. 1. *Aleurocystis haggallae* A) Basidiocarp in section and from above, B) Part of hymenium, C) Dendrohyphidia, D) Cystidium, E) Basidiospores. From the holotype of *Aleurodiscus capensis*.

Cystidia present, conical, coarsely encrusted at least in upper part, in lower parts of the hymenial layers encrusted in longer sections, conical to club like in the subhymenium, thick-walled, projecting to embedded in many layers 50-150 μm long, 10-14 μm wide in the middle, usually tapering towards the base.

Dendrohyphidia present, hyphoid and with few blunt and short side branches, up to 65 μm long.

Basidia clavate, 4-sterigmata, 60-90 \times 14-20 μm , with a basal clamp.

Basidiospores subglobose, hyaline, smooth, negative in Melzer's reagent, 16-22 \times 14-17 μm .

Habitat. On dead hardwoods.

Distribution. Pantropical, but not common.

Remarks. The species reminds about a discoid *Aleurodiscus* or *Cytidia*, but separated easily from these genera by the combination of non-amyloid spores and metuloids cystidia. In the field it may be mistaken for a small jelly fungus because of its gelatinous to waxy consistency.

Specimens studied: South Africa, Natal, 1917. P. van der Byl no 34029, holotype of *Aleurodiscus capensis* Lloyd (BPI); Brazil, Rio Grande do Sul. S. Leopoldo, 1930, J. Rick (K); South Africa, Stellenbosch, 1916, A. V. Duthie 154, holotype of *Cytidia cornea* LLoyd (BPI); Malawi, Mulanje Mts. Lichenya hut. 9. March 1973, R. 11355 (O).

***Aleurocystis magnispora* (Burt) Lemke Fig. 2**

Can J. Bot. 42: 760, 1964.

Stereum magnisporum Burt, Ann. Mo. Bot. Gard. 7: 207, 1920.

Cytidia magnispora (Burt.) Welden, Mycologia 50: 305, 1958.

Basidiocarps annual, cupulate to more widely effused with distinct lifted margin at least in dry condition, reminding about a thin *Stereum* basidiocarp, separable, gelatinous and waxy when fresh, horn to cartilaginous and dense when dry, up to 800 μm thick, abhymenial surface smooth or minutely tomentose, hymenial surface smooth to slightly tuberculate or undulating, deep ochraceous to buff, subiculum thin and white.

Hyphal system monomitic; generative hyphae with clamps, thin-walled in the subhymenium, but rapidly gelatinized in KOH and difficult to separate in sections, richly branched, 4-8 μm wide, in the subiculum thick-walled and branched, often with apparent simple septa because the clamp connections are gelatinized, in swollen parts up to 20 μm wide.

Cystidia present, conical, coarsely encrusted, at least in upper part, in lower parts of the hymenial layers encrusted in longer sections, conical to club like in the subhymenium, thick-walled, projecting to embedded in many layers, 50-100 μm long, 15-20 μm wide in the middle, usually tapering towards the base.

Dendrohyphidia absent.

Basidia clavate, 4-sterigmata, 60-90 \times 14-20 μm , with a basal clamp.

Basidiospores ellipsoid, hyaline, smooth, negative in Melzer's reagent, 13-15 \times 22-25 μm .

Habitat. On dead hardwoods.

Distribution. Neotropical, but rare, we have seen specimens from Colombia, and Jamaica.

Remarks. The species comes close to *A. hakgallae*, but is separated partly by distribution, but above all by far more ellipsoid spores and the lack of dendrohyphidia.

Specimens studied: Jamaica, Chester Vale, W.A. & E. L. Murrill 328, holotype (NY); Colombia, Bogota, Cundinmarcha, 16 km west on road to Medellin. 2700 m.a.s.l. 3. June 1978 Ryv. 15573 (O).

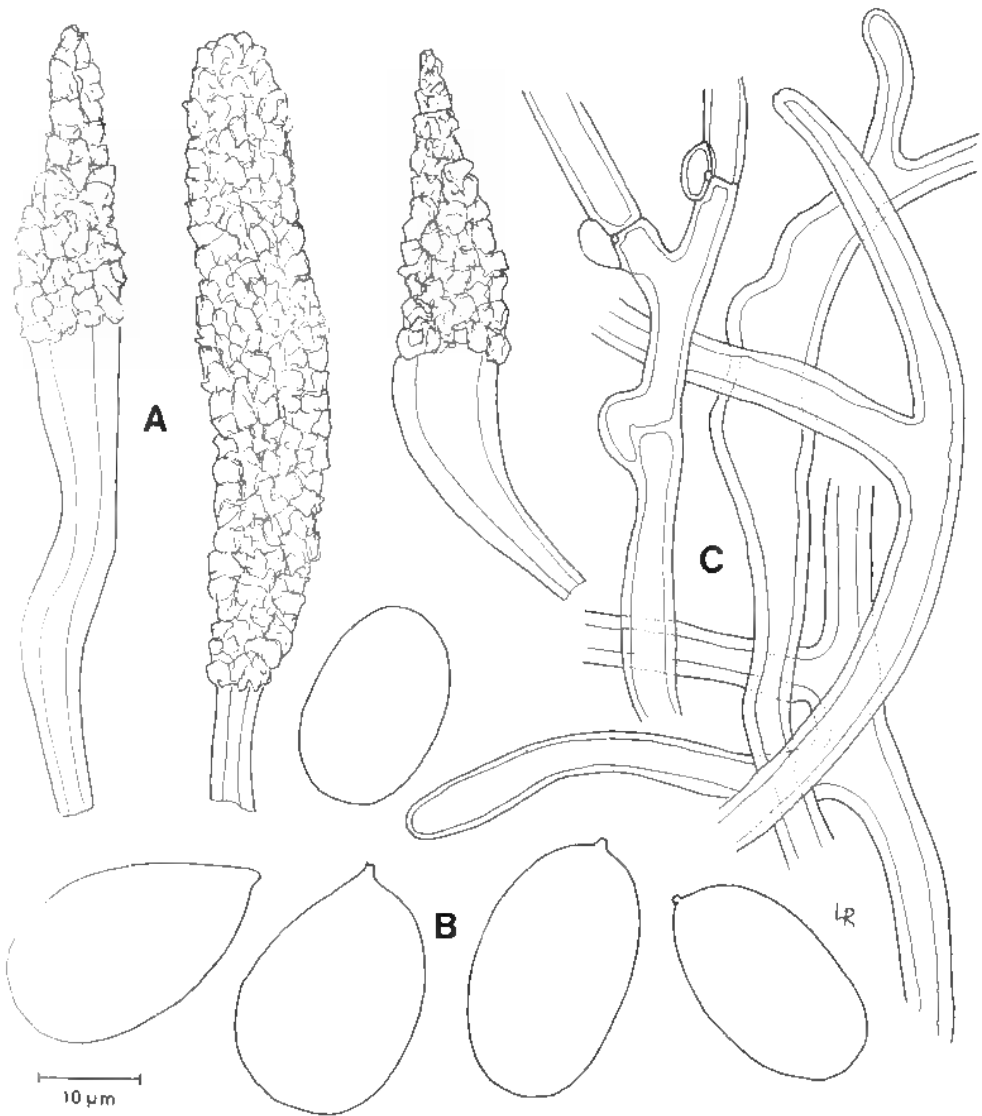


Fig. 2. *Aleurocystis magnispova* A) Cystidia, B) Basidiospores, C) Generative hyphae from the subiculum. From Ryvarden 15573.

LITERATURE CITED

- NUNEZ M. & RYVARDEN L., 1997 — The genus *Aleurodiscus* (Basidiomycotina). *Synopsis Fungorum* 12: 1-164.
 RYVARDEN L., 1991 — Genera of polypores. *Synopsis Fungorum*. 5: 1-363.

**ZELLEROMYCES HISPANICUS SP. NOV. (RUSSULALES,
ELASMOMYCETACEAE), AN ORANGE-RED SPECIES
POSSIBLY RELATED TO LACTARIUS AURANTIACUS**

F. D. CALONGE¹ & D. N. PEGLER²

¹Real Jardín Botánico, C. S. I. C., Plaza de Murillo 2, 28014 Madrid, Spain.

²The Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3AB, UK.

SUMMARY: *Zelleromyces hispanicus* is proposed and described as a new species, together with details on the ecology, morphology, anatomy and related taxa. The possible phylogenetic links with *Lactarius aurantiacus* are discussed.

KEY WORDS: Elasmomycetaceae, *Zelleromyces hispanicus*, taxonomy, ecology, Spain.

RESUMEN: Se describe *Zelleromyces hispanicus* como especie nueva para la ciencia y se aportan datos sobre su ecología, morfología y parentesco con especies próximas. Se propone una hipótesis sobre su posible relación filogenética con *Lactarius aurantiacus*.

PALABRAS CLAVE: Elasmomycetaceae, *Zelleromyces hispanicus*, taxonomía, ecología, España.

RÉSUMÉ: *Zelleromyces hispanicus* est proposé comme une espèce nouvelle, avec commentaires sur l'écologie, morphologie et relations aux espèces alliées. Les possibles affinités phylogénétiques avec *Lactarius aurantiacus* sont discutés ici.

MOTS-CLÉS: Elasmomycetaceae, *Zelleromyces hispanicus*, taxonomie, ecologie, Espagne.

INTRODUCTION

The genus *Zelleromyces* was described by Singer & Smith (1960) as a member of the 'astrogastraceous series', now generally referred to as the gasteroid Russulales. It is characterized by astipitate gasterocarps, with an enclosed gleba, a laticiferous system producing latex and basidiospores which are both statismosporic and orthotropic with an amyloid ornamentation. It was based upon the type species *Z. cinnabarinus* Sing. & A. H. Sm., from Louisiana, U.S.A., and five other North American species were included in the original publication. Additional accounts by Beaton *et al.* (1984), Malençon (1975), Pegler & Young (1979) and Tao *et al.* (1993) have raised the number of species to around thirteen worldwide. Pegler & Young (1979) placed the genus in Elasmomycetaceae, separating it

from *Martellia* Mattir., on the basis of the production of latex, although the two genera are similar in other respects, each include species with spores having either a reticulate or spinose ornamentation. Subsequently Beaton *et al.* (1984) restricted *Zelleromyces* to the reticulate-spored species.

The genus has not hitherto been recorded from Spain, so that the following account represents the first record for the country. The collections studied have been deposited in Madrid (MA-Fungi) and Kew (K).

DESCRIPTION

Zelleromyces hispanicus Calonge & Pegler, sp. nov.

Gasterocarpus 2-5 cm latus, subglobosus vel lobatus, tuberoideus, sessilis, ad basim depressus. Peridium alutaceis, laeve, glabrum. Latex albidus. Gleba pallide aurantiaca, in sicco rosea alutacea, loculis irregulariter dispersitis. Columella nulla vel rudimentaria. Sporae statismosporicae, orthotropicae, 9-12 (-14) × 8-10 µm, subglobosae vel late ovatoeae, hyalinae, tenuitunicatae, grosse reticulatae amyloideae, basidia 25-35 × 5-12 µm, cylindrico-clavata, 2- vel 4- sporigera. Cystidia 20-40 × 8-10 µm, lageniformia. Trama hymenophoralis cum hyphae afibulatae, hyalinae, elementis laticiferis instructa; sphaerocytis carens. Peridiopellis pseudoparenchymatica.

Madrid, Cercedilla, Dehesas, subhypogaeus, subter *Pinus sylvestris*, 27-XI-1996, legit F. D. Calonge & C. Garcia Ruz. MA-Fungi 37498 (holotypus); K(M) 54685.

Gasterocarp sessile, subhypogeous, 2-5 cm diam., tuberoid, globose to ellipsoid, with a depressed base surrounding the point of attachment. Peridium smooth, matt, orange when fresh drying reddish brown. Gleba pale cream drying yellowish pink, labyrinthoid; latex present, whitish, unchanging. Gleba! locules irregularly arranged, partially filled. Columella absent or rudimentary; stipe absent; sterile base poorly developed. Odour aromatic; taste sweetish, astringent to somewhat hot. Peridiopellis very thin, 100-200 µm thick, made of two layers: the outer one pseudoparenchymatous, with isodiametric elements, 10-20 µm diam. with brownish vacuolar pigment; some crystals and residual soil debris are also observed (fig. 1a). Inner layer made of gelatinizing, agglutinated hyphae, hyaline, septate and clampless (fig. 1b). Basidia 25-35 × 5-12 µm, cylindrico-clavate, 2-4 sterigmata 5-8 µm long (fig. 2a). Basidiospores 9-12 (-14) × 8-10 µm, including reticulum, subglobose to broadly ovoid, hyaline, with an ornamentation of continuous or interrupted ridges forming an incomplete reticulum, overlaid strongly amyloid myxosporium (figs. 3-4). Sphaerocytes absent. Cystidia present, projecting beyond hymenial elements, 20-40 × 8-10 µm, lageniform, hyaline, thin-walled, with guttulate bodies irregular in size (fig. 2b). Laticiferous elements present 2-8 µm diam., vermiform, aseptate, branching, thin-walled, with strongly refractive yellowish amber contents, scattered throughout the hymenophoral tramal plates (fig. 1c). Hymenophoral trama made of hyaline hyphae, 3-6 µm diam., thin-walled, branching, septate, clampless (fig. 1d).

Specimens examined: Spain, Madrid, Cercedilla, Dehesas, in granitic soil under *Pinus sylvestris*, also with associated scattered bushes of *Adenocarpus*, *Citrus*, *Crataegus*, *Rosa*, *Rubus* and abundant basidiomata of *Lactarius aurantiacus*; 27-XI-1996, coll. F. D. Calonge & C. Garcia Ruz. MA-Fungi 37498 (holotype), K(M)54685; 23-XI-1996, coll. J.

Daniel & J. M. Santos, MA-Fungi 37497, K(M)54685; 16-XI-1997, coll. R. Cifuentes, MA-Fungi 38311.

DISCUSSION

The genus *Zelleromyces* demonstrates a cosmopolitan distribution, at least as far as the temperate-subtropical regions are concerned. The species, however, tend to be localised. The only European species hitherto described, *Z. stephensii* (Berk.) A. H. Sm., is only rarely found, but is known from the Czech Republic, England (type locality), France, Germany, Italy and Switzerland. The bright orange to reddish brown colouration of the peridium strongly suggests the present species but the spore ornamentation is consistently verrucose to spinose, and lacking any reticulation. Other red species include *Z. josserandii* Malençon, from Morocco with a brick red to tawny red peridium and, like *Z. hispanicus*, is associated with *Pinus* (also *Cedrus* and *Fagus*) but the subreticulate spores are significantly smaller, $8.6-11 \times 7.2-8.6 \mu\text{m}$, cystidia are lacking and the peridiopellis is a subepithelium. In North America, *Z. gardneri* (Zeller & Dodge) Singer & A.H. Sm., from California, and *Z. ravenelii* (Berk. & M. A. Curtis) Singer & A. H. Sm., from the eastern United States, are similar in many features but have cream-coloured to brown gasterocarps. *Zelleromyces daucinus* Beaton, Pegler & Young, from Victoria State, Australia, is a carrot red species but has smaller spores, lacks cystidia and has an epithelial peridiopellis. Perhaps, the type species, *Z. cinnabarinus* Singer & A. H. Sm., from Louisiana, U. S. A., most closely approaches to *Z. hispanicus*, having a cinnabar red gasterocarp, spores of comparable size, range and ornamentation, and the development of hymenial cystidia, but sphaerocytes are present and the peridiopellis is subepithelial.

Zelleromyces hispanicus differs from all the above species most noticeably in the complete absent of sphaerocytes, both in the peridiopellis and in the context giving a homoimerous structure, yet the laticiferous system, the latex, and the amyloidity of the spores indicates the species is correctly placed amongst the genera of the Russulales, within the family Elasmomycetaceae.

Hydangium aurantiacum R. Heim & Malençon was described (Heim *et al.*, 1934) as a subhypogeous fungus from Montserrat, north of Barcelona, in the Catalan region of Spain. The yellowish orange pigmentation of the peridium suggested to these authors a relationships with *Stephanospora carotaecolor* (Berk. & Br.) Pat. Following an extensive search, the type collection of *H. aurantiacum* was located at Paris (PC) and it has been possible to make a comparison with *Z. hispanicus*. The peridiopellis is pseudo-prosenchymatous, very thin, 20-50 μm thick, discontinuous or lacking, the basidiospores do not have an amyloid myxosporium, as originally described, and the short, truncate cusporial ridges remain isolated and do not anastomose. Combining the characteristics of the spore with the additional micro-characters of the presence of clamp-connexions and the absence of laticiferous hyphae, eliminates *H. aurantiacum* from both, Elasmomycetaceae and Russulales. Svrcek (1958) placed *H. aurantiacum* within *Octaviania* Vittad. (= *Octavianina* Kuntze), but the nature of the spore ornament precludes this possibility. Heim *et al.* (1934) were probably correct in comparing the species with *Stephanospora* Pat. (Stephanosporaceae Oberw. & E. Horak), even though the basidiospore lacks the periapendicular corolla found in *S. carotaecolor*. Comparison can be made with *S. flava* (Rodway) Trappe & Pfister from Tasmania and Australia; *S. penangensis* Corner &

Hawker from Malaysia and *S. redolens* (G. Cunn.) E. Horak from New Zealand, all of which have spores lacking a corolla.

Growing in close proximity to the *Zelleromyces* gasterocarps were large numbers of the agaricoid species, *Lactarius aurantiacus* (Pers.: Fr.) Gray, with similar orange to tawny pigmentation. Further similarities in the structure of the pileipellis, the latex and laticiferous system, and the presence of lageniform cystidia could suggest that there may be a close relationship between the two species. There are marked differences in spore form, however, which may be due to the ballistospory or otherwise of the two species. In *Z. hispanicus* the spore are truly statismosporic in form, radially symmetrical, lacking a suprahilar plage and larger. *Lactarius aurantiacus* spores, on the other hand, are typically ballistosporic in form, bilaterally symmetrical, with an applanate, inamyloid suprahilar plage, and measuring 7-11 x 6-9 μm (figs. 5-6). It remains to be determined whether or not the two species are phylogenetically linked.

ACKNOWLEDGEMENTS: The authors are grateful to Mr. M. Jerez for valuable SEM assistance. FDC acknowledges the financial support received from the DGES and CSIC, under research project no. PB 95-0129-003-01; and to Monsieur le Directeur Alain Couté and Mr. Gérard Mascarell from the Herbar de Cryptogamie (PC), their great help sending us on loan the type of *Hydnangium aurantiacum*.

REFERENCES

- BEATON G., PEGLER D. N. & YOUNG T. W. K., 1984 - Gasteroid Basidiomycota of Victoria State, Australia 2. Russulales. *Kew bulletin* 39: 669-698.
- HEIM R., FONT-QUER P. & CODINA J., 1934 - Fungi Iberici. Observations sur la flore mycologique Catalane. *Treballs del museu de ciencias naturals de Barcelona* 15, sér. bot. no. 3: 3-146, pl. 1-4; figs. 1-22.
- MALENÇON G., 1975 - Champignons hypogés du Nord de l'Afrique II. Basidiomycetes. *Revue de mycologie* 39: 279-306.
- PEGLER D. N. & YOUNG T. W. K., 1979 - The gasteroid Russulales. *Transactions of the british mycological society* 72 (3): 353-388, 134 figs.
- SINGER R. & SMITH A. H., 1960 - Studies in secotiaceous fungi IX. The astrogastraceous series. *Memoirs of the Torrey botanical club* 21: 1-112.
- SVRCEK, M., 1958 - *Octaviania* Vitt. In Pilat, A. Gasteromycetes. *Flora CSR B-1*: 189-202. Praha.
- TAO, K., CHANG, M. C. & LIU, B. (1993). [New species and new records of hypogeous fungi from China IV]. *Acta mycologica sinica* 12: 103-106.

1

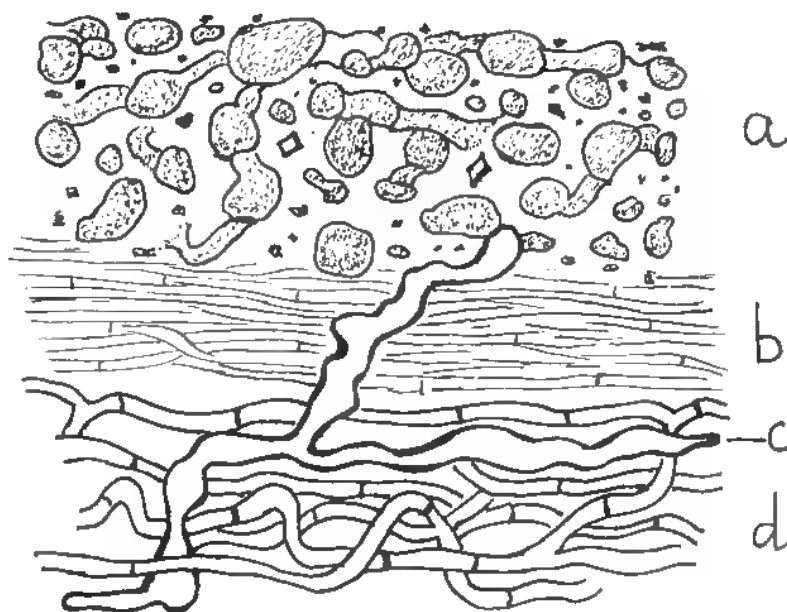


Fig. 1. *Zelleromyces hispanicus* (MA-Fungi 37498, holotype). Diagram of peridial, context and hymenophoral trama anatomy: a, pseudoparenchymatous peridiopellis with vacuolar pigment; b, context of hyaline, gelatinized hyphae; c, laticiferous element; d, hymenophoral trama with septate hyphae lacking clamp-connexions.

2

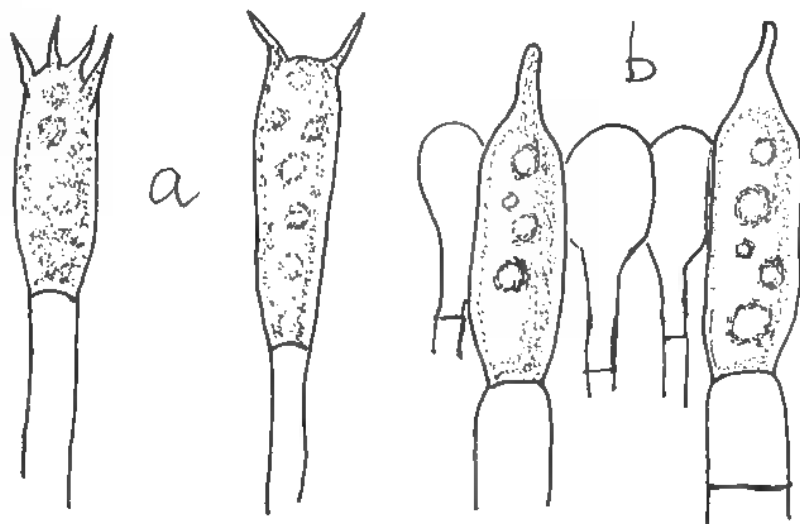
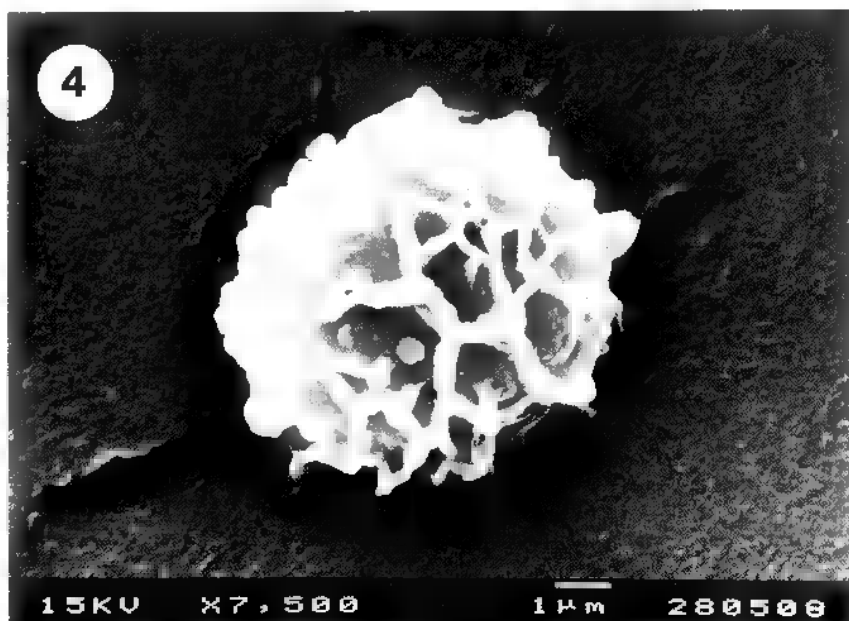
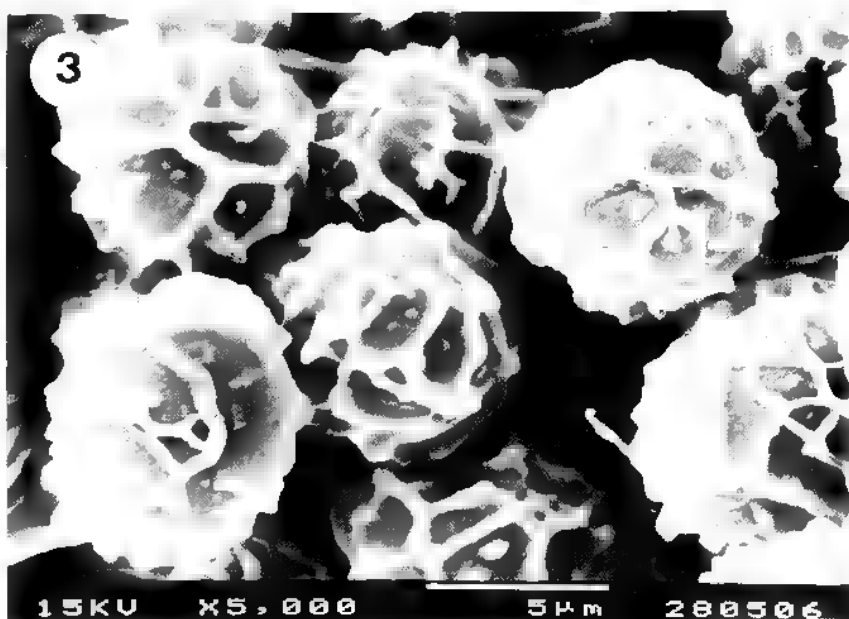
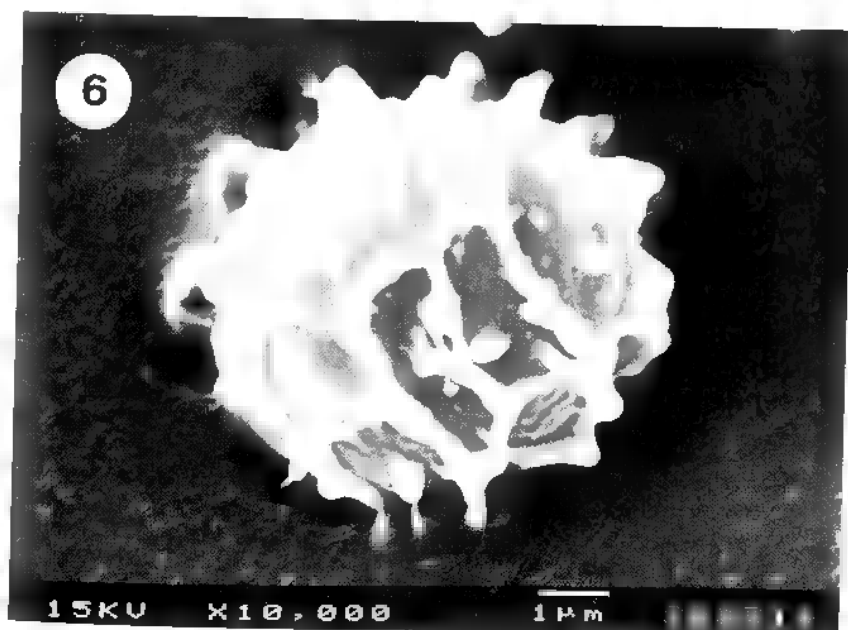
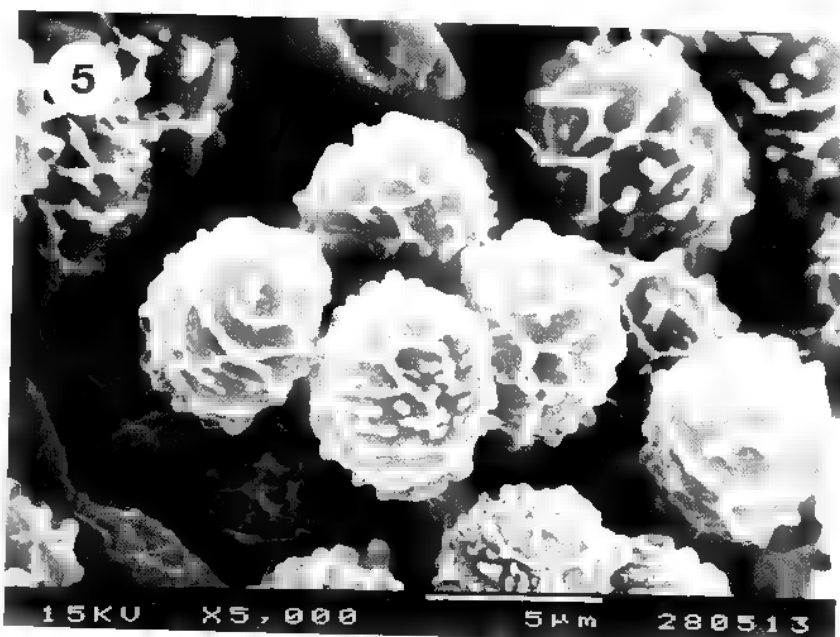


Fig. 2. *Zelleromyces hispanicus* (MA-Fungi 37498, holotype). a, bi- and tetrasporic basidia; b, projecting, lageniform hymenial cystidia.



Figs. 3-4. *Zelleromyces hispanicus* (MA-Fungi 37498, holotype), basidiospores.



Figs. 5-6. *Lactarius aurantiacus* (MA-Fungi 37499), basidiospores.

ZELLEROMYCES GIENNENSIS SP. NOV. (RUSSULALES), A GASTEROID FUNGUS FROM THE SOUTH OF SPAIN

B. MORENO-ARROYO¹, J. GOMEZ² & F.D. CALONGE³

1. Depto. de Biología y Ecología, Facultad de Ciencias,
Universidad de Córdoba,
Avda. San Alberto Magno, s/n,
14004 Córdoba, Spain.
2. Asociación Micológica de las Sierras Subbéticas,
Mesones, 4. 14800 Priego, Córdoba, Spain.
3. Real Jardín Botánico, CSIC, Plaza de Murillo, 2.
28014 Madrid, Spain.

SUMMARY : *Zelleromyces giennensis* is proposed and described as a new species, including data on its taxonomy, ecology, morphology, anatomy and relationships with related species.

KEY WORDS : Russulales, Elasmomycetaceae, *Zelleromyces giennensis*, taxonomy, ecology, Spain.

RESUMEN : Se propone *Zelleromyces giennensis* como especie nueva para la ciencia, y se aportan datos sobre su taxonomía, ecología, morfología, anatomía, así como semejanzas y diferencias con especies próximas.

PALABRAS CLAVE : Russulales, Elasmomycetaceae, *Zelleromyces giennensis*, taxonomía, ecología, España.

RÉSUMÉ : *Zelleromyces giennensis* est proposé comme nouvelle espèce, avec l'apport de données sur la taxonomie, l'écologie, la morphologie, l'anatomie et les relations avec les taxa proches.

MOTS-CLEFS : Russulales, Elasmomycetaceae, *Zelleromyces giennensis*, taxonomie, ecologie, Espagne.

INTRODUCTION

In previous papers (Calonge & Pegler, 1998; Moreno-Arroyo *et al.* 1998a, b) has been discussed the possible delimitation of the genus *Zelleromyces* Singer & A. H. Sm., in relation to *Martellia* Mattir. and *Gymnomyces* Masee & Rodway, and the key proposed by Beaton *et al.* (1984) is considered as the most suitable one to separate the genera of Elasmomycetaceae. The number of *Zelleromyces* species already described reaches the figure of 15, from which only two have been previously recorded in Spain, *Z. hispanicus* Calonge & Pegler (Calonge & Pegler, 1998) and *Z. meridionalis* Calonge, Moreno-Arroyo

& Gómez (Moreno-Arroyo *et al.* 1998a). The material studied here is preserved in Madrid (MA-Fungi) and in the personal senior author's herbarium (BM).

DESCRIPTION

Zelleromyces giennensis. Moreno-Arroyo, Gómez & Calonge sp. nov. (Figs. 1-4)
Etym.: *giennensis*, belonging to the province of Jaen, S. Spain.

Gasterocarpus 1-2.5 cm *latus*, *subglobosus*, *vel lobatus*, *sessilis*. *Peridium album*, *deinde alutaceis*, *laeve*, *glabrum*. *Gleba alba*, *deinde alutacea*, *loculis irregulariter elongatis*. *Columella nulla*. *Sporae statismosporicae*, 10-13 × 7-9 µm, *ovoideae vel ellipsoideae*, *reticulatae amyloideae*. *Basidia* 30-45 × 6-10 µm, *cylindrica*, *1-sporigera*. *Cystidia nulla*. *Trama hymenophoralis cum hyphae afibulatae*, *hyalinae*. *Peridium cum elementis laticiferis instructa*. *Sphaerocystis carens*. *Epicutis in trichodermium*. *Peridiopellis pseudoprosenchymatica*. *Hispania, Giennen, La Aliseda, subhypogeus, subter Pinus halepensis, 28-II-1994, legit J. Gómez et B. Moreno, MA-Fungi 38674 (Holotypus); BM 213.*

Gasterocarp 1-2.5 cm diam., subglobose, somewhat lobed, sessile (Fig. 1). **Peridium** whitish drying pale yellowish, smooth, matt. **Gleba** white drying yellowish, labyrinthoid, with locules irregularly arranged, empty or partially filled. **Columella** absent. **Basidiospores** 10-13 × 7-9 µm (incl. orn.), ellipsoid, rarely ovoid (Figs. 2-4), hyaline, with a myxosporium of continuous or interrupted ridges forming an incomplete reticulum (Figs. 3-4), strongly amyloid. **Basidia** 30-45 × 6-10 µm, cylindrical, 1-spored. **Sterigma** 3-5 µm long. **Subhymenium** pseudoparenchymatous. **Cystidia** absent. **Hymenophoral trama** made of hyaline hyphae, 3-6 µm diam., gelatinized, thin-walled, septate, clampless. **Peridiopellis** 150-200 µm, pseudoprosenchymatous, with gelatinized, agglutinated hyphae. **Epicutis** a trichodermium, with hyaline hyphae, 4-5 µm diam., septate, gelatinized. **Laticiferous elements**, 5-8 µm diam., only present in the peridium. **Sphaerocysts** absent.

Material studied: Spain, Jaen, La Aliseda, 600 m, subhypogeous, under *Pinus halepensis*, 30 basidiomata forming colonies, 28-II-1994, legit J. Gómez & B. Moreno, MA-Fungi 38674 (Holotypus); BM 213.

DISCUSSION

Zelleromyces giennensis is a well-defined species with a series of characters not found in any other described taxon of this genus. Basidiospores subreticulate, ellipsoid; peridium with laticiferous hyphae; epicutis a trichodermium; basidia 1-spored, and columella, cystidia and sphaerocysts absent.

Other species with ellipsoid spores are: *Z. cinnabarinus* Singer & A. H. Sm., which has ■ cinnabar red peridium when fresh and broader spores (14-17 × 11-13 µm); *Z. oregonensis* Singer & A. H. Sm., with spiny spores (Singer & Smith, 1960). *Zelleromyces gardneri* (Zeller & Dodge) Singer & A. H. Sm., has spores similar to *Z. giennensis*, ellipsoid to ovoid, but shows a dendroid columella (Singer & Smith, 1960). Another Mediterranean species close to our material is *Z. jossierandi* Malençon (Malençon, 1975), but with spores ovoid, basidia 4-spored and basidioma broader, 2-4 cm diam. The remaining species of *Zelleromyces* are remote from *Z. giennensis*, considering the taxonomic features.

Again, we have had difficulties in finding the appropriate genus for our collections, as commented upon in previous occasions (Moreno-Arroyo *et al.*, 1998a, b). However, the presence of reticulate spores, laticiferous hyphae in the peridium and absence of sphaerocysts induced us to include it within *Zelleromyces*, following Beaton *et al.* (1984) and Zhang & Yu (1990).

Zelleromyces giennensis seems to be a Mediterranean species associated with *Pinus halepensis*, being the third of a series of species recently found in Spain: *Z. hispanicus* Calonge & Pegler (Calonge & Pegler, 1998) growing under *Pinus sylvestris* and *Z. meridionalis* Calonge, Moreno-Arroyo & Gómez (Moreno-Arroyo *et al.*, 1998a) which grows under *Quercus ilex* subsp. *ballota*. It is expected that these fungi are widespread in our region and that new gasteroid Russulales will be found in future, as the attention and effort put in this subject is increased.

ACKNOWLEDGEMENTS: We express our gratitude to Dr. G. López González for critical comments and to Mr. M. Jerez for valuable SEM assistance. One of us (FDC) acknowledges the financial support received from the DGES and CSIC, under research project no. PB 95-0129-003-01.

REFERENCES

- BEATON G., PEGLER D. N. & YOUNG T. W. K., 1984 — Gasteroid Basidiomycota of Victoria State, Australia 2. Russulales. *Kew bulletin* 39: 669-698.
- CALONGE F. D. & PEGLER D. N., 1998 — *Zelleromyces hispanicus* sp. nov. (Russulales, Elasmomycetaceae), an orange-red species possibly related to *Lactarius aurantiacus*. *Cryptogamie, mycologie* 19: in press.
- MALENÇON G., 1975 — Champignons hypogés du Nord de l'Afrique II. Basidiomycetes. *Revue de mycologie* 39: 279-306.
- MORENO-ARROYO B., GÓMEZ J. & CALONGE F. D., 1998a — *Zelleromyces meridionalis* (Russulales, Elasmomycetaceae), a new species from Spain. *Mycotaxon* (in preparation).
- MORENO-ARROYO B., GÓMEZ J. & CALONGE F. D., 1998b — *Gymnomyces dominguezii* sp. nov. (Russulales, Elasmomycetaceae), from Spain. *Mycological research* (in press).
- SINGER R. & SMITH A. H., 1960 — Studies on secotiaceus fungi. IX. The astrogastraceous series. *Mem. Torrey Bot. Club* 21: 1-112.
- ZHANG B. C. & YU Y. N., 1990 — Two new species of gasteroid Russulales from China, with notes on taxonomy of *Gymnomyces*, *Martellia* and *Zelleromyces*. *Mycological research* 94: 457-462.

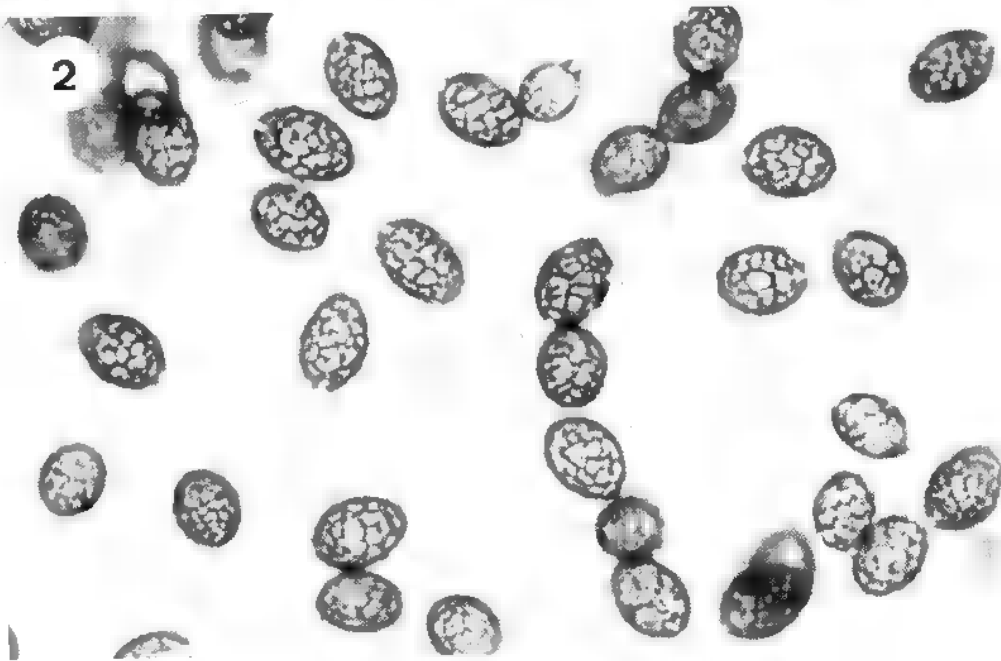
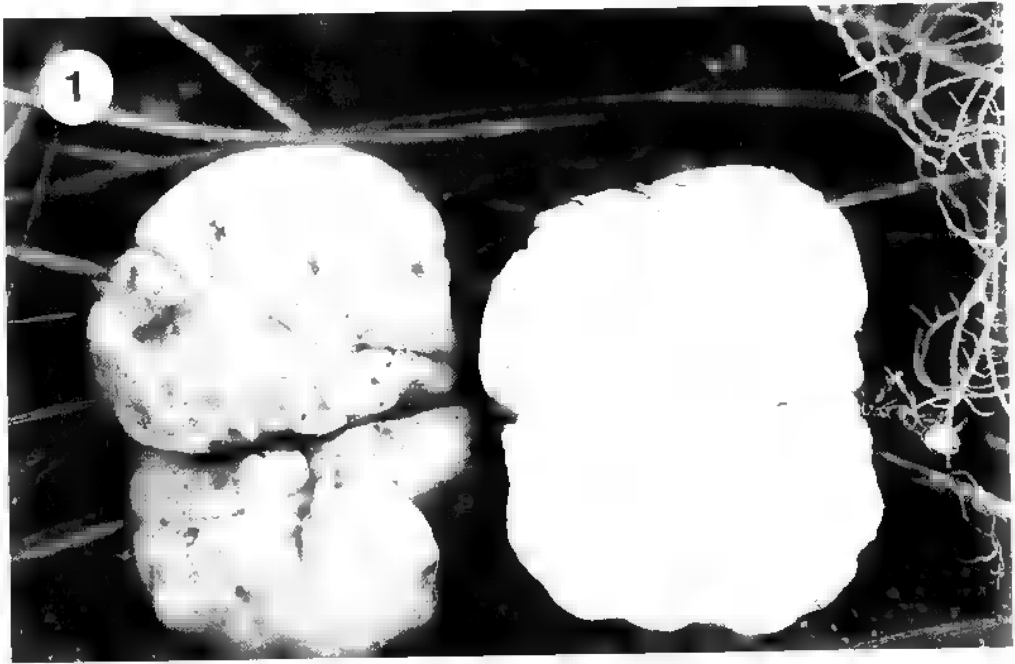
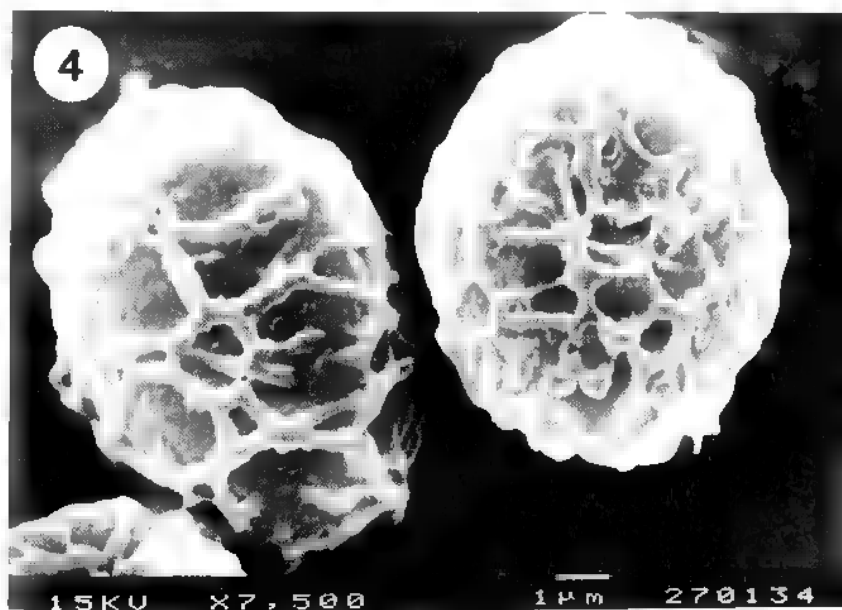
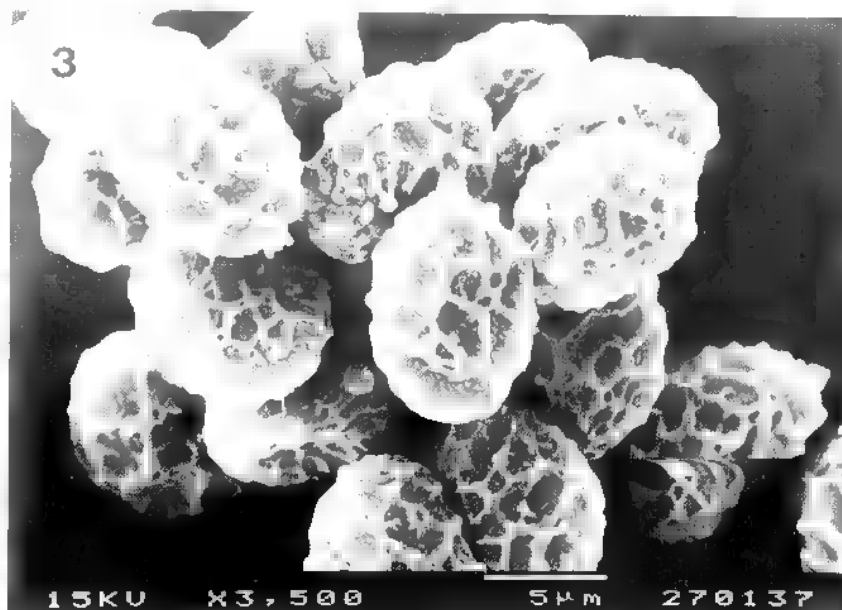


Fig. 1. — *Zelleromyces giennensis*. Basidiomata showing peridium and gleba. MA-Fungi 38674.
 Fig. 2. — *Zelleromyces giennensis*. Basidiospores observed under the LM, after treatment with KOH.
 A typical subreticulate, amyloid myxosporium can be distinguished. MA-Fungi 38674.



Figs. 3-4. — *Zelleromyces giennensis*. Basidiospores observed under SEM at different magnification to see in more detail the subreticulate myxosporium. MA-Fungi 38674.

***TUBER PSEUDOEXCAVATUM* sp. nov.
A NEW SPECIES FROM CHINA COMMERCIALISED IN SPAIN,
FRANCE AND ITALY WITH ADDITIONAL COMMENTS
ON CHINESE TRUFFLES**

Y. WANG¹, G. MORENO², L. J. RIOUSSET³, J.L. MANJÓN², G. RIOUSSET³,
G. FOURRÉ⁴, G. DI MASSIMO⁵ L.G. GARCÍA-MONTERO² & J. DíEZ²

1. Systematic Mycology and Lichenology Laboratory,
Beijing, China;
present address: New Zealand for Crop & Food Research Institute Limited,
Invermay Agricultural Centre,
Mosgiel, New Zealand.
2. Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Ciencias,
Universidad de Alcalá,
28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.
3. 7, Allée Jousé d'Arbaud,
13910 Maillane, France.
4. 152 rue Jean Jaurès, 79000 Niort, France.
5. Dpto. Biología Vegetale,
Università degli Studi di Perugia,
Borgo XX Giugno 74, 06100 Perugia, Italy.

ABSTRACT: A new *Tuber* species is described from China which has been commercialised in Spain, France, and Italy. *Tuber pseudoexcavatum* is described and illustrated and additional comments on Chinese truffles are presented.

KEY WORDS: *Tuber pseudoexcavatum*, taxonomy, truffle market, legislation, Spain, France, China.

RÉSUMÉ: Des espèces de *Tuber* de Chine, commercialisées en Espagne et en France ont été étudiées. Une nouvelle espèce, *T. pseudoexcavatum* est proposée et entièrement décrite. Les truffes chinoises sont commentées.

MOTS CLEFS: *Tuber pseudoexcavatum*, taxonomie, marché de la truffe, législation, Espagne, France, Chine.

In Southwest China many truffle species have been commercially collected as food stuffs for a long time. Truffles are indeed an important resource in some regions of China. In particular, the large ascocarps of *Tuber sinense* (up to 10 cm in diam or more) are very abundant, while *T. pseudoexcavatum* and other species are more rare and have much smaller ascocarps.

The 1990's have seen the appearance of Chinese truffles at European markets particularly, *Tuber indicum* (Manjón *et al.*, 1995; Fourré *et al.*, 1996). In 1994, massive amounts of imported Chinese truffles began to arrive at French markets. This stimulated the French authors to investigate the identity of a number of Chinese *Tuber* species. In 1995 H. G. Fourré contacted and communicated with Dr. Wang Yun, a Chinese mycologist working on Chinese truffles in New Zealand. J. L. Rioussel recognized that there were two Chinese truffle species which had been marketed in France, one is *Tuber sinense* Tao & Liu which is similar to *T. melanosporum* Vitt. and the other which was undescribed was similar to *T. excavatum* Vitt. (Fourré, pers. comm. 1995).

Some weeks later L.J. & G. Rioussel received imported Chinese truffles from various French merchants. Most of these specimens were identified as *Tuber indicum* Cooke & Massee, but other specimens defied identification. These unidentifiable specimens were brown in color, subglobose and deeply excavate and also had eight ascospores per asci. It became apparent that it was a new species conspecific with the new species that Dr. Wang found in Huidong Sichuan of China.

L. J. Rioussel has concluded that this undescribed *Tuber* species is commonly imported into France under the name *Tuber indicum* Cooke & Massee.

A similar story has been revealed for this species in Spain. Chinese truffles were first imported into Spanish markets in 1994 and their quantities has increased since. Interestingly most of these specimens imported in Spain came from France. As happened in France some of these Chinese truffles were identified as *T. indicum* (Manjón & *al.*, 1995) and others were considered by the Spanish as a new species. When Dr. Moreno discussed the new species with Dr. L.J. & G. Rioussel and G. Fourré, they agreed that both Spain and France had the same undescribed species which Dr. Yun had provisionally named *Tuber pseudoexcavatum*.

The presence of *Tuber indicum* Cooke & Massee in Italian markets has been confirmed by Montecchi (1996).

MATERIAL AND METHODS

Ascocarps were collected from pine forest soils in Huidong, Sichuan, China and also in markets in Spain and France. Ascocarps were dried at room temperature and deposited in herbariums as listed.

Scanning electron photomicrographs were made with a Zeiss DSM-950 microscope. Spore samples were rehydrated with 100% ammonium hydroxide for 30 min, then dehydrated in aqueous ethanol solutions (70%) for 1-1.5 h, before fixation in formaldehyde dimethylacetal, (after immersion in acetone for at least 2 h). Ascospores were subsequently critical point dried, mounted onto an aluminium stub, and coated with gold-palladium in a Polaron E-5000 sputter coater for 120 sec at 1.4 kV and 18 mA (argon atmosphere) creating a metal coating approximately 500 Å thick. Light photomicrographs were made with a Nikon Labophot microscope equipped with an automatic photographic system.

DESCRIPTION

Tuber pseudoexcavatum Wang, G. Moreno, L. J. Rioussset, J. L. Manjón & G. Rioussset, sp. nov. (Figs. 1-3)

Diagnosis: *Ascocarpa subglobosa penitus excavata*, usque ad 3.5 cm in diam, brunnea, verrucosa. *Peridium bistratum*, 290-470 mm crassum. *Epicutis cellulis inflatis usque ad 20 mm, brunneis, subcutis hyphis hyalinis, intertextis, 3-5 mm in diam. Gleba solida alba demum canobrunnea, venis albis. Asci sporis 1-8, subglobosis vel irregularis. Ascosporae ellipsoideae, (23-) 24-28 (-35) × (17-) 18-19 (22-) μm, spinoreticulatae.*

Habitat in soils sylvarum montis usque ad 2000-2300 m supra mare, Sichuan provincia, 26 November 1989. Y. Wang & D. Ch Zhang, paratypus IFS89911. Imported from China: Yunnan, January 1995, L. J. Rioussset Herbarium 01 14 03 95 holotypus, isotypus in AH 18387.

Etymology: *pseudoexcavatum* in reference to the similarity of this species to *Tuber excavatum*.

Ascocarp subglobose, deeply excavate, brown to brown-orange, up to 3.5 cm in diam, with a coarsely warted surface.

Peridium 290-500 μm thick, composed of distinct outer and inner layers. Outer layer, 190-350 μm thick (including warts), the outmost 3-5 layers of cells, subglobose, brown-red, 10-20 μm of diam, thick-walled (1-3 μm); just below these dark outermost cells lie pale subglobose cells which become smaller when they are closer to the inner layer (Figs. 1a, 1b). Inner layer 100-140 μm thick, composed of hyaline, filamentous interwoven hyphae, 3-9 μm in diam, thin-walled.

Gleba solid, white in youth but becoming gray-brown as spores mature, marbled with meandering, white veins of hyaline, interwoven hyphae, 3-5 μm in diam. Odour soft.

Asci subglobose, reniform or irregular, sometimes with short remains of croziers, 45-70 × 60-85 (-105) μm, with 1-8 clustered ascospores, inamyloid, indehiscent, randomly embedded in gleba tissue. (Figs. 1d-h).

Ascospores ellipsoid, spinoreticulatae, variable in size, depending on the number of ascospores within an ascus (23-) 24-28 (-35) × 16-19 (-22) μm (excluding the ornamentation), on the average, (21-) 24-30 (-35) × 16-22 μm (1-spored asci), (23-) 25-30 (-34) × (17-) 18-20 (-22) μm (2-spored asci). Young ascospores hyaline, smooth, becoming dark brown, spinoreticulatae when mature. Spines up to 5 (-8) μm tall and 1-2 mm thick at the base, hyaline in the youth becoming brown to dark brown, with broad basal connections tending to form a reticulation composed of variable meshes (Figs. 1d-h), but homogeneous in all the spore surfaces (Figs. 2a-f).

Habitat: in calcareous soils at 3-10 cm in depth under *Pinus yunnanensis* Franch at elevations of 2000-2300 m, fruiting from August to November.

Material studied: *Tuber pseudoexcavatum*, collected from pine forest soils in Huidong, Sichuan, China, 26 November 1989, deposited in the Herbarium of Institute of Forestry & Soil Sciences. IFS 89912, IFS 89913, IFS 89914, IFS 89916, IFS 89919, IFS 89920, IFS 89922, leg. A.P. Li & Y.W. Li. IFS 89911, IFS 89910, IFS 89915, IFS 89917, IFS 89918; imported from China, January 1995, AH 18384 and AH 18385; imported from China: from pine forest soils in Yunnan, January 1995, L. J. Rioussset Herbarium 01 14 03 95 holotypus, isotypus in AH 18387.

Material studied of other species: *Tuber pseudohimalayense*. Probably imported from China, in January of 1995. AH 18331 *holotypus*. *Tuber himalayense isotypus* AH 18383. *Tuber indicum*: Probably imported from China, in January of 1995. AH 18329

Remarks: *Tuber pseudoexcavatum* is characterized by ascocarps which are subglobose, deeply excavate, brown to brown-orange, with a coarsely warted surface, and asci with 1-8 ascospores with spinoreticulatae ornamentation.

There are two other *Tuber* species with excavated ascocarps, *T. excavatum* Vitt. and *Tuber mesentericum* Vitt. The former differs by the smooth ascocarp surface, (1)3-5(6) spores per ascus and reticulated spores without spines. While *T. mesentericum* has dark black ascocarps, 1-5 (-6) spores per ascus and reticulated spores without spines.

Other Chinese *Tuber* species are *T. sinense* Tao & Liu (Tao & Liu, 1989), *T. gigantisporum* Wang & Li (Wang & Li, 1991), *T. indicum* Cooke & Masee (Cooke & Masee, 1892), *T. himalayense* Zhang & Minter (Zhang & Minter, 1988) and *T. pseudohimalayense* G. Moreno, Manjón, Díez & García-Montero (Moreno & al. 1997). *Tuber pseudoexcavatum* differs from these other Chinese species by the excavated ascocarp and the 8-spored asci.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Dr. M.A. Castellano for the scientific suggestions and comments, and review of English manuscript. We also thank the "Servicio de Microscopía Electrónica" of the University of Alcalá for their aid with the S.E.M. We thank A. Montecchi for his valuable comments and suggestions. We are especially grateful to Mr. J. Cunill for providing some of the specimens studied. We thank Francesco Meotto, Centro di Studio sullo Micologia del Terreno C.N.R. de Torino (Italy) for loan of the isotype of *Tuber himalayense*. Finally we are grateful for the financial support of the Project to the INIA (SC94-129), DGICYT (PB95-0165) and to the Fundación Caja de Madrid. The senior author thanks the Systematic Mycology and Lichenology Laboratory, Beijing, China for financial support.

LITERATURE CITED

- FOURRÉ G., RIOUSSET L. J. & RIOUSSET G., 1996 — Ces "truffes de l'Inde" qui nous arrivent de Chine. *Bulletin de la fédération des associations mycologiques méditerranéennes* 9: 3-21.
- MANJÓN J. L., MORENO G., DÍEZ J. & GARCÍA-MONTERO L. G., 1995 — *Tuber indicum* Cooke & Masee en España: Una especie comercializada con características similares a nuestra trufa negra. *Boletín de la sociedad micología. Madrid* 20: 301-304.
- MONTECCHI A., 1996 — *Tuber indicum* Cooke & Masee. XXI Mostra Reggiana del fungo. *Il Fungo suppl.* 3 (14): 27-30.
- MONTECCHI A. & LAZZARI G., 1993 — *Atlante fotografico di funghi ipogei*. Associazione Micologica Bresadola. Centro Studi Micologici. Vicenza.
- MORENO G., MANJÓN J. L., DÍEZ J., GARCÍA-MONTERO L. G. & Di MASSIMO G., 1997 — *Tuber pseudohimalayense* sp. nov. an asiatic species commercialized in Spain, similar to the "Perigord" truffle. *Mycotaxon* 63: 217-224.
- TAO K. & LIU B., 1989 — A new species of the genus *Tuber* from China. *Journal of Shanxi University (Nat. Sci. Ed.)* 12 (2): 215-218.

- TRAPPE J. M., JUMPPONEN A. M. & CÁZARES E., 1996 — Nats truffle and truffle-like fungi 5: *Tuber lyonii* (= *T. texense*), with a key to the spiny-spored *Tuber* species groups. *Mycotaxon* 60: 365-372.
- UECKER F. A. & BURDSALL H. H., 1977 — *Tuber spinoreticulatum*, a new truffle from Maryland. *Mycologia* 69: 626-630.
- WANG Y. & LI Z. P., 1991 — A new species of *Tuber* from China. *Acta Mycologia Sinica* 2: 12-15.
- ZHANG B. C. & MINTER D. W., 1988 — *Tuber himalayense* sp. nov. with notes on Himalayan truffles. *Transactions of the british mycological society* 91(4): 593-597.
- ZHANG D. Ch. & WANG Y., 1990 — Study on Chinese truffle and its ecology. *Edible Fungi of China* 9 (2): 25-27.

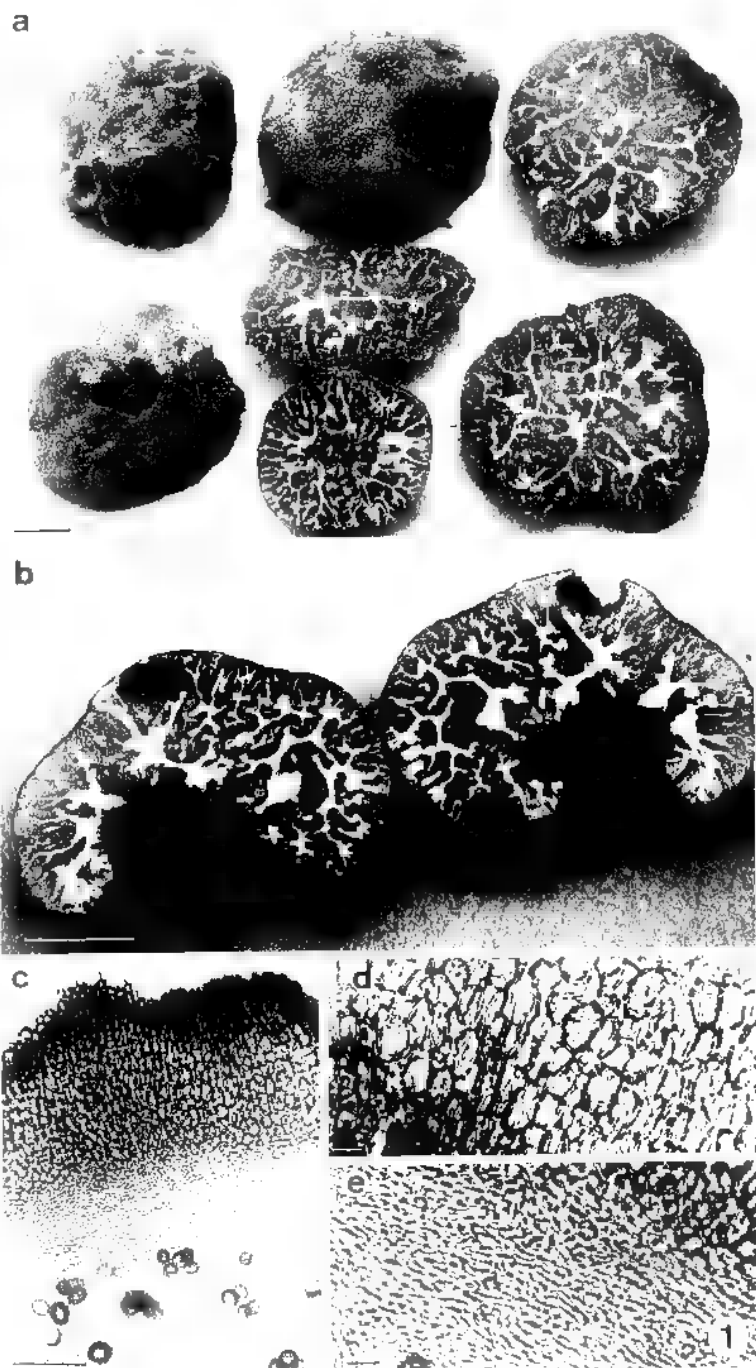


Fig. 1. — *Tuber pseudoexcavatum* (Holotypus): a-b. ascocarps and glebal detail; c. detail of the external peridium; d. thick-walled, globose cells of the external peridium; e. plectenquimatic cells of the internal peridium. Bars : a, b = 1 cm ; c = 100 μ m ; d, e = 5 μ m.

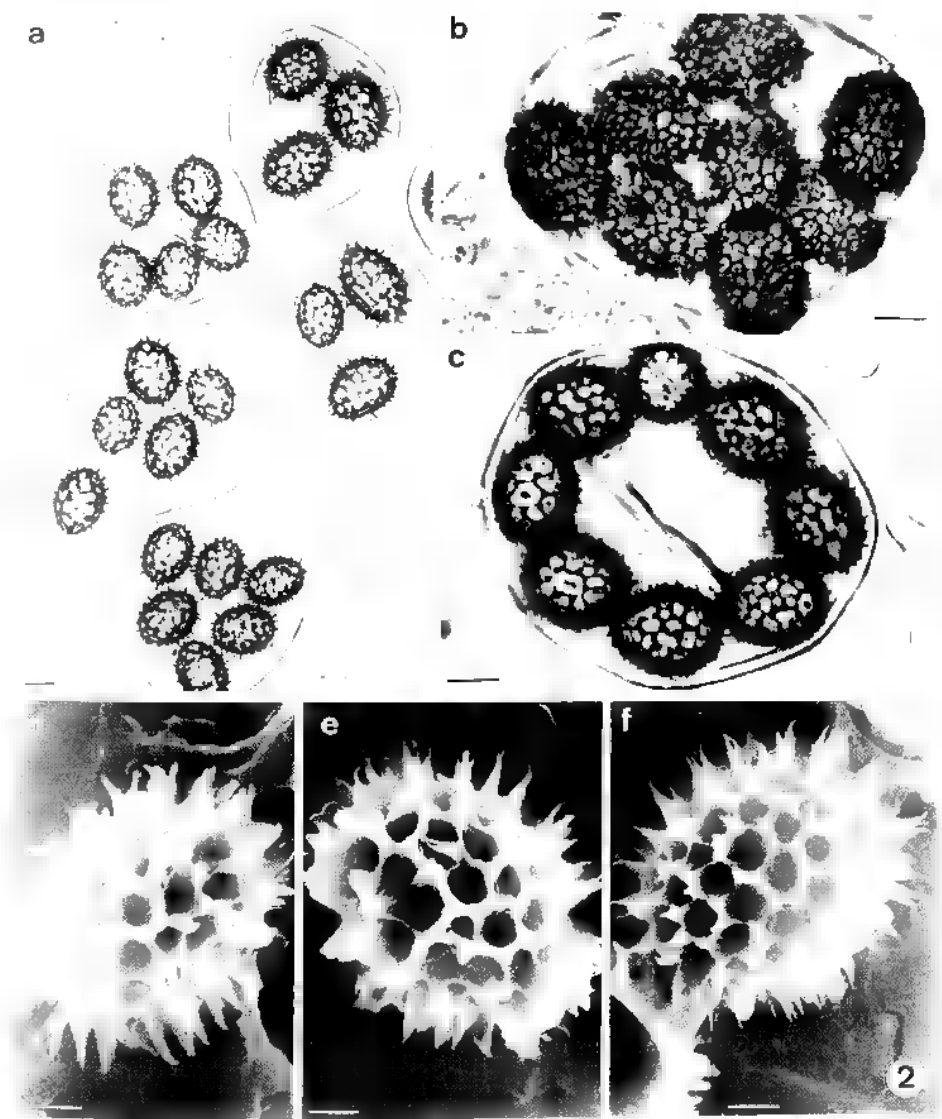


Fig. 2. — *Tuber pseudoexcavatum* (Holotypus): a-c. asci with 3, 5, 6 and 8 ornamented ascospores; d-f. SEM micrographs of ascospores, showing the detail of the ornamentation. Bars: a-c = 10 μ m; d-f = 5 μ m.

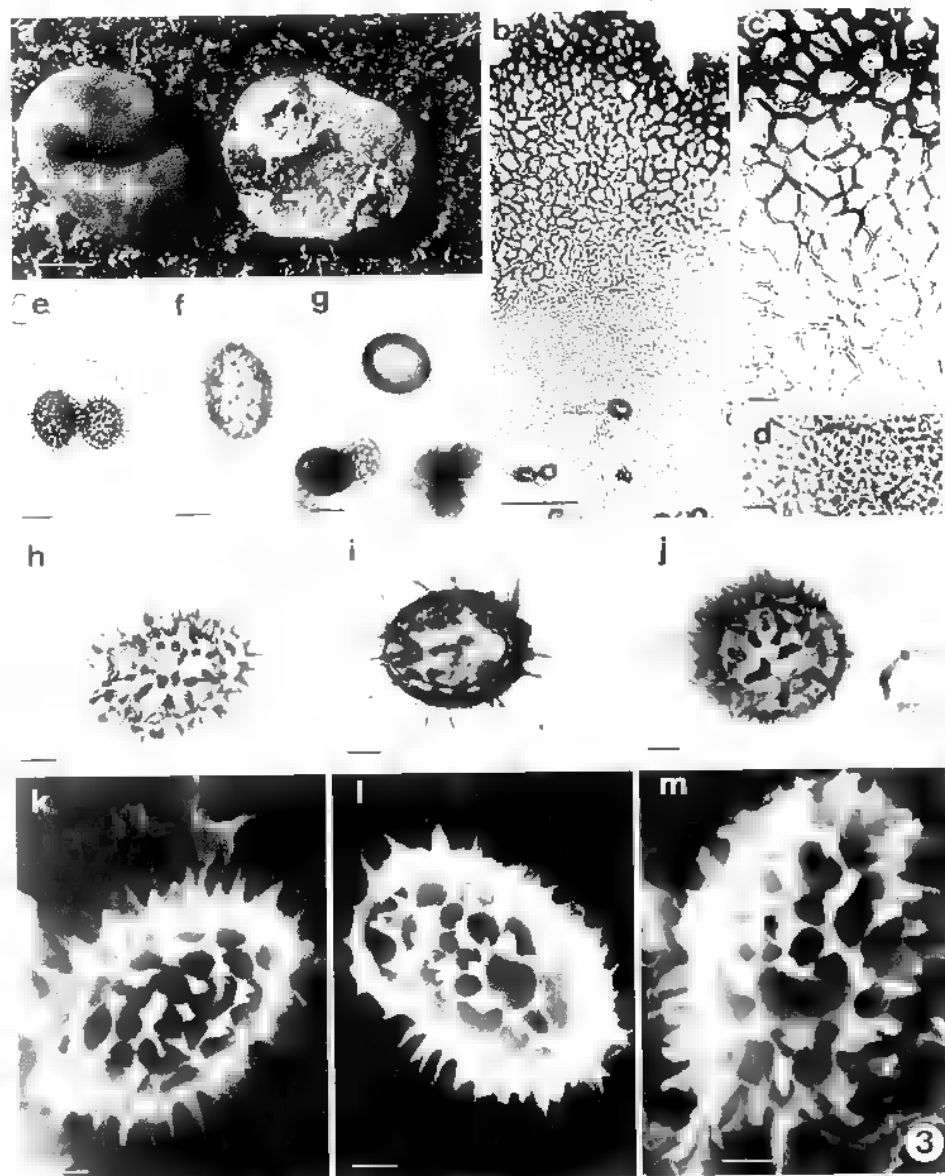


Fig. 3. — *Tuber pseudoexcavatum* (AH 18384); a. ascomycete and detail of the gleba; b. detail of the external peridium; c. thick-walled, globose cells of the external peridium; d. cells plectenquimatic of the internal peridium; e-g. asci with 1 and 2 ascospores; f. h-j. ascospores with spines with broad basal connections to form a reticulum; k-m. SEM micrographs of ascospores, showing the detail of ornamentation. Bars : a = 1 cm ; b = 100 μ m ; c-g = 10 μ m ; h-m = 5 μ m.

**ESTUDIO MICOLÓGICO DE LA RESERVA DE LA BIOSFERA
“EL CANAL Y LOS TILES” (LA PALMA, ISLAS CANARIAS).
IV. AGARICOMYCETIDAE (3ª parte). GÉNERO *INOCYBE*.**

F. ESTEVE-RAVENTÓS¹, Á. BAÑARES^{2*}, E. BELTRÁN³ & J.L. RODRÍGUEZ³

*Autor para la correspondencia

¹Dpto. de Biología Vegetal (Botánica),
Universidad de Alcalá de Henares.

28.871 Alcalá de Henares. Madrid.

²Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
Parque Nacional del Teide. Apdo. 1.047.

Santa Cruz de Tenerife.

³Dpto. de Biología Vegetal (Botánica),
Universidad de La Laguna. Santa Cruz de Tenerife.

RESUMEN — En el presente trabajo se dan a conocer ocho especies del género *Inocybe* (Fr.)Fr. recolectadas en la Reserva MAB “El Canal y Los Tiles”, constituyendo siete de ellas nuevas citas para el Archipiélago Canario. De éstas, se ofrece una descripción, ilustración microscópica y algunos comentarios.

ABSTRACT — A list of eight *Inocybe* (Fr.)Fr. species collected in the MAB Reserve “El Canal y Los Tiles” is presented; seven of them are new to the Canary Islands. Descriptions, microscopic illustrations and some comments are given.

KEY WORDS — *Inocybe*, Agaricales, taxonomy, Canary Islands, Spain.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo constituye la cuarta aportación al estudio de los hongos superiores de la Reserva de la Biosfera “El Canal y Los Tiles” (La Palma), el cual se enmarca en un estudio más amplio de la flora criptogámica de dicha zona. El Proyecto ha sido subvencionado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica del Ministerio de Educación y Ciencia (DGICYT, nº PB-87/1.004).

Esta comunicación complementa dos aportaciones al estudio de los Agaricales de la Reserva (Bañares *et al.*, 1992; 1994), habiéndose proporcionado en la primera de ellas una descripción de las características generales de la zona de estudio. En esta ocasión, la totalidad de las especies estudiadas corresponden al género *Inocybe* (Fr.) Fr. subg. *Inocybe*, recolectados en bosque de pinar mixto, una comunidad ecotónica de *Cisto-Pinon canariensis* Rivas Goday & Esteve *ex* Sunding y el fayal-breza (Fayo-*Ericion arboreae* Oberdorfer), en ocasiones con abundancia local de *Cistus symphytifolius* Lam. en el sotobosque, el cual protagoniza junto a *Pinus canariensis* Chr. Sm. *ex* DC., las etapas más genuinas del pinar.

Se adicionan un total de 8 especies al catálogo de la mencionada Reserva, constituyendo 7 de ellas nuevas citas para el Archipiélago Canario, de las cuales ofrecemos una breve descripción e iconografía microscópica. A pesar de que con anterioridad se han publicado diversos trabajos que hacen referencia al género *Inocybe* en Canarias (Beltrán & Wildpret, 1975; Höiland, 1979; Bañares, 1988), el presente trabajo demuestra el potencial florístico que este género micorrizógeno aporta al pinar canario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las preparaciones microscópicas han sido realizadas en agua destilada y KOH 5%, fotografiadas en un microscopio modelo BHC (Olympus) con contraste de fase y sistema fotográfico incorporado. La película utilizada fue Kodak 5053 TMY 400 asa.

El material estudiado se encuentra depositado en el Herbario TFC Mic., de la Universidad de La Laguna y un duplicado del mismo se encuentra en el Herbario AH, de la Universidad de Alcalá de Henares.

Localidades estudiadas

El material ha sido recolectado en las dos localidades de la zona de estudio que describimos a continuación, a las cuales se hace referencia mediante su correspondiente numeración al tratar cada una de las especies. En el apartado de especies dominantes sólo citamos aquellas que muestran una cobertura importante en el sector.

I. Casa del Monte

Altitud: 1.300 m s.m. Exposición: NW. Pendiente: 30%

Fisonomía de la vegetación: Pinar mixto (pinar con fayal-breza) en suelo ácido.

Especies dominantes: *Pinus canariensis*, *Erica arborea* L., *Myrica faya* Ait., *Dryopteris oligodonta* (Desv.) Pic.-Serm.

II. Canal de Marcos y Corderos

Altitud: 1.250 m s.m. Exposición: W-NW. Pendiente: 0%

Fisonomía de la vegetación: Pinar mixto con jara, en suelo ácido.

Especies dominantes: *Pinus canariensis*, *Cistus cf. symphytifolius*, *Erica arborea*, *Myrica faya*.

RESULTADOS

Inocybe cincinnata (Fr. Fr.) Quél., Mém. Soc. Emul. Montbéliard, sér. II, 5: 179 (1872).
(Fig. 1)

= *Inocybe phaeocomis* (Pers.) Kuyper

= *Inocybe cincinnatula* Kühner

Material estudiado. — II: 30-11-1991 (TFC Mic. 6.348)

Pileo de 1-1,5 cm de diámetro, pardo oscuro, convexo, subumbonado, fibriloso-escumuloso. Láminas pardas con reflejos violáceos, de arista concolor. Estípite de 12-30 × 2-3 mm, pardo oscuro con reflejos violáceos, cilíndrico, provisto de fibrillas pardocráceas en la base. Esporas de 9-10 × 4,2-5,5 μm, subamigdaliformes, de ápice obtuso a subcónico. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios de 67-78 × 13,5-17 μm, fusiformes, cristalíferos, con paredes de 2 μm, incoloras en amoniaco. Arista formada por queilocistidios semejantes a los pleurocistidios, con numerosos pelos de contenido pardo. Caulocistidios ausentes o sólo en la 1/10 parte apical. Pelos caulocistidioides claviformes, presentes en el ápice.

Observaciones. — Se reporta por primera vez en el Archipiélago Canario. Siguiendo a Heim (1931), nuestro material por su color coincide con *I. obscura* (Pers.) Gillet var. *purpurea* R. Heim, especie que Kuyper (1986) sitúa como sinónimo de *I. amethystina* Kuyper (= *I. obscura* s. Konrad & Maubl., s. Bres.). No obstante, siguiendo al autor holandés, la presencia de un pileo escumuloso, estípite con fibrillas pardo oscuras y arista laminar parda corresponden a *I. phaeocomis*, especie que debe en la actualidad denominarse *I. cincinnata* (Fr.: Fr.) Quél. (Kuyper, 1989).

Inocybe cf. *hirtella* Bres., Fungi trident. 1: 52 (1881). (Figs. 2-3)

Material estudiado. — I: 2-11-1989 (TFC Mic. 6.331), 4-12-1990 (TFC Mic. 6.352).

Pileo de 1,5-2 cm de diámetro, de tonos leonados, mamelonado y escumuloso. Estípite de 50-60 × 2,5 mm, concolor al pileo, sub-bulboso. Esporas de 8,5-9,5 × 4,8-5,5 μm, amigdaliformes, de ápice redondeado. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios pequeños, de 42 × 15-17 μm, fusiformes a sublageniformes, cristalíferos; paredes de 2,5 μm, amarillentas en amoniaco. Caulocistidios semejantes a los pleurocistidios, muy abundantes en toda la superficie del estípite.

Observaciones. — Las características reseñadas nos inclinan a identificar nuestro material con la especie de Bresadola: a pesar de ello no hemos creído conveniente su confirmación por carecer de datos sobre el olor de los carpóforos. Con anterioridad, Höiland (1979) cita *I. hirtella* f. *tetraspora* Kühner (= *I. hirtella* var. *hirtella*) para la Isla de La Palma, en hábitat similar.

Inocybe leptocystis G.F. Atk., Amer. J. Bot. 5: 212 (1918). (Figs. 4-5)

= *Inocybe hygrophila* J. Favre

Material estudiado. — I: 2-2-1991 (TFC Mic. 6.369).

Píleo de 1-3 cm de diámetro, marrón-ocráceo, umbonado y escumoso en carpóforos maduros. Estípite de $30 \times 2.5-3$ mm, blanquecino a ocráceo, liso a débilmente fibriloso, sub-bulboso. Esporas de $8.8-9.5 \times 5.2-5.5$ μm , amigdaliformes, de ápice indistintamente cónico, rara vez subpapilado. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios de $55-78 \times 12-18$ μm , claviformes a subutriformes, capitados, de paredes muy delgadas (< 0.5 μm), con exudados resinosos internos y externos, excepcionalmente con cristales en la parte apical. Caulocistidios ausentes o reducidos a pelos caulocistidioides en la 1/10 parte apical.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. Algunos carpóforos exhiben constantemente pleurocistidios utriformes bastante estrechos (aproximadamente $\times 12$ μm) así como paredes ligeramente engrosadas; no obstante corresponden al rango de mediciones e ilustraciones de Horak & Stangl (1980) y Stangl (1989). Otras especies próximas como *I. obscuroidia* (J.Favre) Grund & D.E. Stuntz, *I. melanopus* D.E. Stuntz o *I. albovelutipes* Stangl nunca presentan exudados externos sobre los cistidios, los cuales no son tan distintamente capitados.

Inocybe muricellata Bres., *Ann. Mycol.* 3: 160 (1905)

= *Inocybe scabelliformis* Malençon (?)

= *Inocybe scabella* (Fr.) Kummer, s. Kühner

Material estudiado. — I: 7-11-1991 (TFC Mic. 6.356), II: 7-11-1991 (TFC Mic. 6.354).

Píleo de 1.5-2.5 cm de diámetro, marrón-ocráceo, convexo, umbonado a veces, fibriloso-escumoso. Estípite largo, de $40-75 \times 3-5$ mm, blanquecino con tonalidades rosadas, subbulboso, pruinoso en toda su superficie, con tomento blanco en la base. Esporas de $9.3-12 \times 5.5-6.3$ μm , subamigdaliformes, de ápice cónico. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios de $58-70 \times 13-20$ μm , lageniformes a fusiformes, a veces cilíndricos, cristalíferos, de paredes gruesas (~ 2.7 μm), desde apenas amarillentas hasta intensamente amarillas en amoniaco. Queilocistidios semejantes a los pleurocistidios. Caulocistidios igualmente semejantes, presentes hasta media altura, mezclados con cauloparacistidios.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. Parte de nuestro material (TFC Mic. 6.354) coincide con la descripción de *I. scabelliformis* Malençon (Malençon & Bertault, 1970), ya que sus paredes cistidiales no se tornan amarillas en amoniaco. No obstante, seguimos a Kuyper (1986) quien incluye a este taxon como sinónimo de *I. muricellata* Bres.

Con anterioridad, Cool (1924) cita *I. cf. scabella* Fr. para la isla de Tenerife; no obstante, la inexistencia de material de herbario nos impide saber si se trata de la misma especie. El taxon de Fries constituye un *nomen dubium*, interpretado de diferentes formas por los autores europeos (Kuyper, *op. cit.*: 234).

Inocybe obscuroidia (J. Favre) Grund & D.E. Stuntz, *Mycologia* 69: 407 (1977). (Fig. 6)

= *Inocybe tenuicystidiata* Horak & Stangl

= *Inocybe leptocystis* G.F. Atk., s. Kühner

Material estudiado. — I: 30-11-1991 (TFC Mic. 6.339)

Pileo de 2-2,5 cm de diámetro, marrón, convexo y subumbonado, fibriloso-subescamuloso radialmente; disco mas oscuro y liso. Estipite largo, de 70-85 × 5-6 mm, ocráceo-blanquecino, sub-bulboso, longitudinalmente fibriloso, pruinoso en la parte apical. Olor espermático cuando fresco. Esporas de 7,5-9,5 × 4-5 μm, subamigdaliformes a veces con ápice sub-papilado y depresión suprahilar. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios de 50-85 × 10,5-12,2 (-18) μm, con la parte superior de 7-8,5 μm de ancho, cilíndricos, fusiformes a sublageniformes, con un cuello alargado, a veces flexuoso, rara vez más o menos utriformes, escasamente cristalíferos; pared estrecha (-0,6 μm) con tonalidad amarillenta. Queilocistidios semejantes a los pleurocistidios. Caulocistidios ausentes. Pelos mas o menos filamentosos o esferopedunculados presentes en el ápice del estipite.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. Nuestro material coincide perfectamente con la descripción de Kuyper (1986) a excepción de la ausencia de tonalidades rojizas en el estipite, carácter que este autor cita como inconstante para la especie. El verdadero *I. leptocystis* G.F. Atk. también presente en la zona de estudio, de cistidios característicamente utriformes, constituye una denominación incorrecta de *I. obscurobadia*, que los autores europeos han dado constantemente a la especie de Favre.

Inocybe posterula (Britzelm.) Sacc., *Syll. Fung.* 5: 778 (1887). (Fig. 7)

= *Inocybe xanthodisca* Kühner

= *Inocybe geophylla* (Fr.: Fr.) Kummer var. *lutescens* Gillet

Material estudiado. — I: 2-12-1989 (TFC Mic. 6.330), 4-12-1990 (TFC Mic. 6.360), 30-11-1991 (TFC Mic. 6.367).

Pileo de 3-6 cm de diámetro, blanquecino-crema, umbonado a sub-umbonado, liso y brillante, radialmente fibriloso; el disco ocre-leonado a menudo con una débil tonalidad anaranjada, algo tomentoso a sub-escamoso, a veces agrietado. Estipite de 30-75 × 4-10 mm, blanquecino (mas claro que el pileo), cilíndrico o algo ensanchado en la base, fibriloso-pruinoso en el ápice; cortina presente. Olor espermático. Esporas de 8,5-9,3 × 4,7-5,4 μm, más o menos elipsoidales a subamigdaliformes, de ápice obtuso a subcónico. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios de 47-52 × 11,7-17 μm, fusiformes a sublageniformes, cristalíferos, de paredes no muy gruesas (1,7-2,3 μm), amarillentas a moniacas. Queilocistidios semejantes a los pleurocistidios. Caulocistidios igualmente semejantes, presentes en la 1/6 parte apical.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. En la zona de estudio, *I. posterula* es abundante en años lluviosos, especialmente en noviembre. Cabe destacar que el material estudiado exhibe el pileo con tonalidades anaranjadas en la zona discal y los cistidios presentan paredes algo mas amarillentas a lo señalado habitualmente en la bibliografía.

Inocybe pudica Kühner, *Ann. Sci. Franche-Comté* 2: 26 (1947). (Figs. 8-10)

= *Inocybe whitei* (Berk. & Broome) Sacc., s. Kuyper

Material estudiado. — I: 28-1-1989 (TFC Mic. 6.336), 4-12-1990 (TFC Mic. 6.357), 2-2-1991 (TFC Mic. 6.353).

Píleo de 2-2.5 cm de diámetro, blanquecino, volviéndose anaranjado-rojizo en la madurez, al principio hemisférico y obtuso con el margen inflexo, después más o menos aplanado; revestimiento del píleo seco, liso, a veces fisurado hacia el disco. Láminas blanquecinas, después ocráceas hasta anaranjadas-rojizas. Estípite de 35-55 × 2,5-6 mm, concolor al píleo en la madurez, aunque menos coloreado, algo ensanchado en la base, pruinoso-fibriloso en el extremo apical (1/6); cortina presente en ejemplares inmaduros. Esporas de 8,5-9,5 × 4,5-5 µm, elipsoidales, alargadas, con el ápice obtuso. Basidios claviformes, tetraspóricos, raramente bispóricos o monospóricos. Pleurocistidios cortos, de 43-50 × 17-21 µm, fusiformes, cristalíferos, de paredes más o menos anchas (2,5-3 µm), apenas amarillentas. Queilocistidios semejantes a los pleurocistidios. Caulocistidios presentes en el 1/3 apical mezclados con cauloparacistidios y pelos caulocistidioides, no cristalíferos.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. Nuestro material coincide muy bien con la especie de Kühner, que Kuyper (1986) considera coespecífica con *I. whitei*; es interesante resaltar que nuestras recolectas presentan carpóforos con dimensiones algo reducidas [píleo de 20-25 mm de diámetro frente a 22-35 mm y estípite de 35-55 × 2,5-6 mm frente a 40-81 × 2,5-8 mm reseñado por Kuyper (*op. cit.*)] y esporas con tendencia a presentar ápice subcónico, más alargadas y estrechas (8,5-9,5 × 4,5-5 µm frente a 8,1-9,1 × 4,7-5,2 µm reseñadas por el autor holandés), probablemente debido a la presencia de basidios trispóricos, bispóricos y monospóricos.

Inocybe subporospora Kuyper, *Persoonia* suppl. 3: 95 (1986). (Fig. 11)

= *Inocybe tarda* Kühner var. *sabulosa* Beller & Bon

Material estudiado. — II: 4-12-1990 (TFC Mic. 6.363).

Píleo de 2-2,5 cm de diámetro, pardo-marrón, fibroso radialmente, no rimoso liso cuando joven, en ejemplares maduros provisto de escuámulas recurvadas. Estípite de 40-50 × 3 mm, blanquecino, pardo-rosado en la parte superior, no bulboso, pruinoso en el 1/3 apical. Esporas de 8,5-9,5 × 5-5,5 µm, amigdaliformes, con el ápice más o menos redondeado y provistas de un diminuto poro germinativo. Basidios claviformes, tetraspóricos. Pleurocistidios cortos, de 47-50 × 12-17 µm, anchamente fusiformes a subtrifurcadas, cristalíferos, con paredes de ~3 µm, incoloras en amoniaco. Queilocistidios semejantes a los pleurocistidios. Caulocistidios presentes en el 1/3 apical.

Observaciones. — Se reporta por primera vez para el Archipiélago Canario. Nuestro material coincide con la descripción original de *I. subporospora*; asimismo coincide con el holótipo de *I. tarda* var. *sabulosa* (estudiado por el primer autor), aunque los cistidios de nuestro material son algo más estrechos (x 12-17 µm frente a 14-22 µm). *Inocybe nitidiuscula* (Britzelm.) Sacc., ampliamente citada para Canarias, constituye una especie de macroscopía semejante a *I. subporospora*, aunque de cistidios lageniformes de mayor tamaño (50-90 × 13-22 µm) y esporas sin poro germinativo evidente. La bibliografía consultada menciona constantemente *I. subporospora* asociado a coníferas en suelos particularmente arenosos; no obstante, en la zona de estudio no existe este tipo de suelo.

BIBLIOGRAFIA

- BAÑARES A., 1988 — *Hongos de los pinares de Tamadaba (Gran Canaria)*. Tenerife, Monografía XXXVI, Instituto de Estudios Canarios (C.E.C.E.L.), 280 p.
- BAÑARES A., BELTRÁN E. & RODRÍGUEZ J. L., 1992 — Estudio micológico de la Reserva de la Biosfera "El Canal y Los Tiles" (La Palma, Islas Canarias) II. *Agaricomycetidae* (1ª parte). *Documents mycologiques* 86: 47-64.
- BAÑARES A., BELTRÁN E. & RODRÍGUEZ J. L., 1994 — Estudio micológico de la Reserva de la Biosfera "El Canal y Los Tiles" (La Palma, Islas Canarias). III. *Agaricomycetidae* (2ª parte). *Cryptogamie, mycologie* 15(1): 1-20.
- BELTRÁN E. & WILDPRET W., 1975 — Taxones nuevos en la flora fúngica canaria. *Vieraea* 5(1-2): 127-166.
- COOL C., 1924 — Contributions a la connaissance de la flore mycologique des Iles Canaries. *Bulletin de la société mycologique de France* 40(1): 129-244.
- HEIM R., 1931 — *Le genre Inocybe*. *Encycl. Mycol.* 1, Paris, Ed. P. Lechevalier, 429 p.
- HÖILAND P., 1979 — Studies in the genus *Inocybe* (Fr.)Fr. (Agaricales) of the western Canary Islands. *Vieraea* 8(1): 13-22.
- HORAK E. & STANGL J., 1980 — Notizen zur taxonomie und verbreitung von *Inocybe leptocystis* Atk.. *Sydowia annales mycologici* Ser II, 33: 145-151.
- KUYPER T. W., 1986 — A revision of the genus *Inocybe* in Europe. Subgenus *Inosperma* and the smooth-spored species of subgenus *Inocybe*. *Persoonia*, Suppl. 3: 1-247.
- KUYPER T. W., 1989 — Studies in *Inocybe* — IV. *Zeitschrift für Mykologie* 55(1): 111-114.
- MALENÇON G. & BERTAULT R., 1970 — *Flore des champignons supérieurs du Maroc*. Vol. 1, Rabat, Cent. Nat. Rech. Sci. France, 601 p.
- STANGL J., 1989 — Die Gattung *Inocybe* in Bayern. *Hoppea* 46: 5-388.

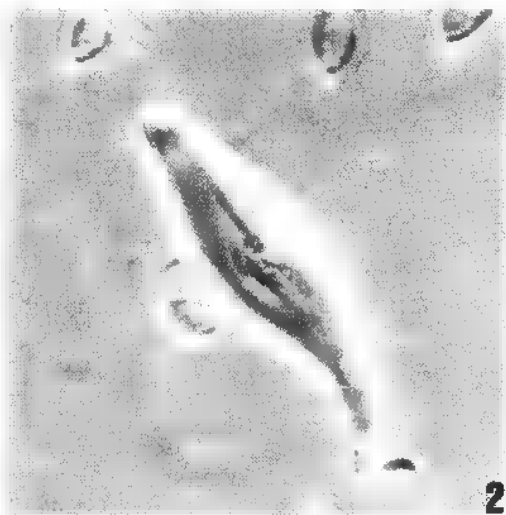
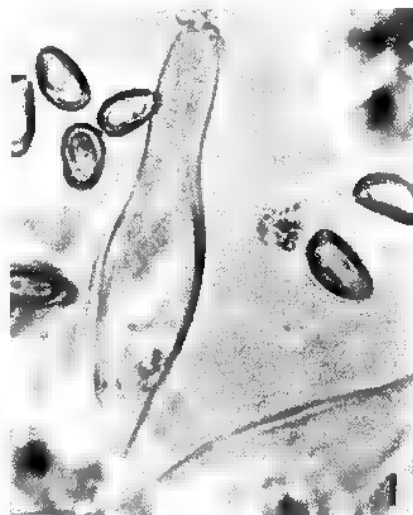


Fig. 1. *Inocybe cincinnata* (Fr.: Fr.) Quél., TFC Mic. 6.348: pleurocystidium y esporas. **Figs. 2-3.** *I. cf. hirtella* Bres., TFC Mic. 6.352: 2, pleurocystidio; 3, esporas. **Figs. 4-5.** *I. leptocystis* G.F. Atk., TFC Mic. 6.369: 4, pleurocystidio; 5, pleurocystidio y esporas. Barra = 10 μ m.

Fig. 1. *Inocybe cincinnata* (Fr.: Fr.) Quél., TFC Mic. 6.348: pleurocystidium and spores. **Figs. 2-3.** *I. cf. hirtella* Bres., TFC Mic. 6.352: 2, pleurocystidium; 3, spores. **Figs. 4-5.** *I. leptocystis* G.F. Atk., TFC Mic. 6.369: 4, pleurocystidium; 5, pleurocystidium and spores. Bar = 10 μ m.



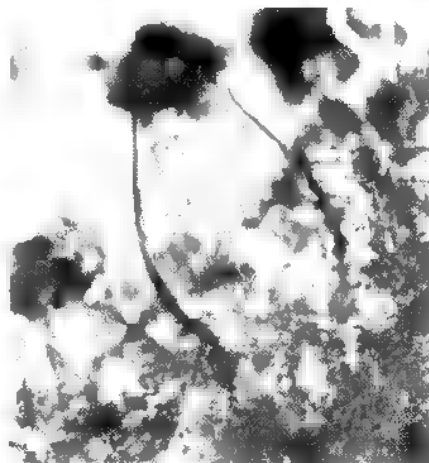
6



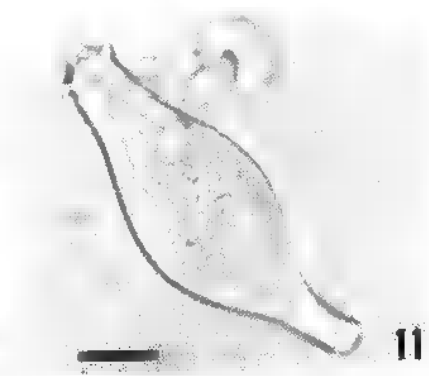
7



8



10



11

Fig. 6. *Inocybe obscurobadia* (J. Favre) Grund & D.E. Stuntz, TFC Mic. 6.339: pleurocystidio y esporas. Fig. 7. *I. posterula* (Britzelm.) Sacc., TFC Mic. 6.367: pleurocystidio. Figs. 8-10: *I. pudica* Kühner, TFC Mic. 6.357: 8, esporas; 9, pleurocystidio; 10, pleurocystidio. Fig. 11. *I. subporospora* Kuyper, TFC Mic. 6.363: pleurocystidio. Barra = 10 µm.

Fig. 6. *Inocybe obscurobadia* (J. Favre) Grund & D.E. Stuntz, TFC Mic. 6.339: pleurocystidium and spores. Fig. 7. *I. posterula* (Britzelm.) Sacc., TFC Mic. 6.367: pleurocystidium. Figs. 8-10: *I. pudica* Kühner, TFC Mic. 6.357: 8, spores; 9, pleurocystidium; 10, pleurocystidium. Fig. 11. *I. subporospora* Kuyper, TFC Mic. 6.363: pleurocystidium. Bar = 10 µm.

CALVATIA PYGMAEA (GASTEROMYCETES) IN THE DESERTS OF BAJA CALIFORNIA SUR (MEXICO)

Carlos OCHOA ¹, Gabriel MORENO ², Alberto ALTÉS ² & Hanns KREISEL ³

¹ Laboratorio de Micología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, 1880 Ensenada, Baja California, México.

² Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

³ Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Ludwig-Jahn-Str. 15a, D-17487 Greifswald, Germany.

RÉSUMÉ — *Lanopila pygmaea*, une espèce uniquement connue par la description originelle de l'Argentine et de la Bolivie, a été récoltée 90 ans plus tard dans des aires désertiques de Baja California Sur (Mexique). Sa combinaison avec le genre *Calvatia* est proposée. Des photomicrographies au microscope optique et microscope électronique à balayage sont incluses.

MOTS CLEFS — *Calvatia*, *Lanopila*, Gasteromycetes, chorologie, taxonomie.

ABSTRACT — *Lanopila pygmaea*, a species only known by the original description from Argentina and Bolivia, has been collected 90 years later in arid areas of Baja California Sur (Mexico). Its combination with the genus *Calvatia* is proposed. Photomicrographs under LM and SEM are included.

KEY WORDS — *Calvatia*, *Lanopila*, Gasteromycetes, chorology, taxonomy.

INTRODUCTION

In January of 1996 two of us (C.O. and G.M.) carried out an exploration of 15 days in desertic areas of Baja California peninsula, in company with members of the University of Baja California and the University of Alcalá, within a research project with the aim to compare mediterranean areas of Spain with Baja California peninsula. A large explored part is rich in Cactaceae. The important fungal diversity in these areas, mainly Myxomycetes, Gasteromycetes, and Agaricales, is very interesting from the point of view of the adaption to extreme hydric situations. At first we expected only scarce collections, but with respect to the groups mentioned above it was quite different: the diversity of Gasteromycetes was exceptionally rich and Myxomycetes were abundant.

In this paper we describe one species, *Lanopila pygmaea* R.E. Fr., which has not been collected again after its discovery by Fries (1909), and propose the combination of this taxon to the genus *Calvatia*.

MATERIALS AND METHODS

The studied specimens are deposited in the herbarium of the University of Alcalá, Spain (AH), in the herbarium of the University of Baja California, Mexico (BCMEX), and in the personal herbarium of H. Kreisel, Greifswald, Germany.

Colour was determined with Locquin's (1975) Natural Color Guide, and the code is given in parentheses. Scanning Electron Microscope (SEM) photographs were made according to Moreno *et al.* (1995).

DESCRIPTION

Calvatia pygmaea (R.E. Fr.) Kreisel, G. Moreno, C. Ochoa & Altés *comb. nov.*
(Figs. 1-30)

Basionym: *Lanopila pygmaea* R.E. Fr., *Arkiv Bot.* 8(11): 16-17, 1909.

Material studied: MEXICO: Baja California Sur, Vizcaino, km 12 Vizcaino-Bahia Tortugas, under *Yucca valida* Brandegees and *Opuntia molesta* Brandegees, leg. G. Moreno, C. Ochoa, C. Illana, M. Lizárraga, R. Galán & N. Ayala, 26.I.1996, AH 18358 (dupl. in herb. Kreisel), Baja California Sur, near Loreto, in vegetation of Cactaceae with *O. molesta*, leg. C. Ochoa, G. Moreno, C. Illana, M. Lizárraga, R. Galán & N. Ayala, 31.I.1996, AH 21501 (dupl. in BCMEX 5481). ARGENTINA: Prov. Jujuy, Pampa Blanca, dry sandy soil in thorny bush vegetation, leg. R.E. Fries, 23.V.1901, R.E. Fries 65a, S (LECTOTYPE of *Lanopila pygmaea*). BOLIVIA: Bolivia australis, Tarija, on rather dry sandy ground under *Acacia* shrubs, leg. R.E. Fries, 11.1902, R.E. Fries 277a, S (SYNTYPE of *L. pygmaea*).

The Mexican specimens present the following features: Basidiocarps 14-25 mm diam., globose, subglobose, or irregularly globose (tuberiform) (Figs. 1-2), separating from the basal mycelium at maturity. Exoperidium about 0.1 mm thick, membranaceous, disrupting in plaques (Fig. 1), glabrous, colour silvery to silvery grey, finally silvery brown. Endoperidium 0.1-0.3 mm thick, pruinose, tomentose to velutinous, breaking irregularly at the apex (Fig. 2), colour brown to greyish brown (D6f, E5f, K4f). Gleba dark brown (A2c). Subgleba absent.

Spores 6-8 µm diam., globose, ochraceous, with thick wall in LM, smooth, with a small hyaline apiculus 1-2 µm long (Figs. 10-12); under SEM the spores are perfectly smooth (Figs. 17-21). Capillitium abundant, 3-7.5 µm diam., thick walled (wall 1-2 µm thick), without pores, branched (Fig. 4), septate (breaking at the septa), frequently sinuose, ochraceous yellow to yellowish brown, with a few narrow and long end branches which sometimes originate from the septa (Fig. 3). Septa are infrequent or very rare, variable in breadth, slightly or nearly not inflated (Figs. 6-9, 15-16). Exoperidium not

much differentiated, formed by subglobose cells and cylindric appressed filaments (structure epidermoidea). Endoperidium consisting of cylindric filaments, 5-8 μm diam., intermixed, ramified, septate, thick walled (wall 1-3 μm thick), brown, similar to the capillitial hyphae.

Remarks: *Calvatia pygmaea* belongs to *Calvatia* section *Lanopila* (Fr.) Kreisel, by lack of subgleba and imperforate capillitium (Kreisel, 1994). Within this section, *C. pygmaea* is unique by its smooth spores even under SEM.

Calvatia pachyderma (Peck) Morgan (another species of *Calvatia* with smooth spores) differs by its larger size (77-170 mm diam.), thicker endoperidium (1-4 mm thick), capillitium with frequent small pores, and smaller spores of 4-5 μm diam. (Moreno *et al.*, 1996).

Calvatia complutensis G. Moreno, Kreisel & Altés differs by its larger size (23-70 mm diam.), exoperidium not membranaceous and not rupturing in plaques, capillitium with medium size pores, and smaller spores of (3.2-)4.8-5.6(-6.4) μm diam., smooth or nearly smooth under LM, but rugose to slightly verruculose under SEM (Moreno *et al.*, 1996).

Two other species with smooth spores are *Lanopila radloffiana* Verwoerd and *Calvatia diguetii* Hariot & Pat. According to our data, only the type collection of both species is known. The former was described from subtropical areas in South Africa (Bottomley, 1948) and the latter from the Californian coasts (Hariot & Patouillard, 1904). Nevertheless, we have not been able to obtain this type material of *L. radloffiana* on loan, but it has been described as having small spores of 3.4-3.8 μm diam. (smaller than those of *C. pygmaea*). In the case of *C. diguetii* we can confirm the larger size of the basidiocarps (40-60 mm diam.), the presence of septate, very pitted capillitium, and smaller spores (3-4 μm diam.).

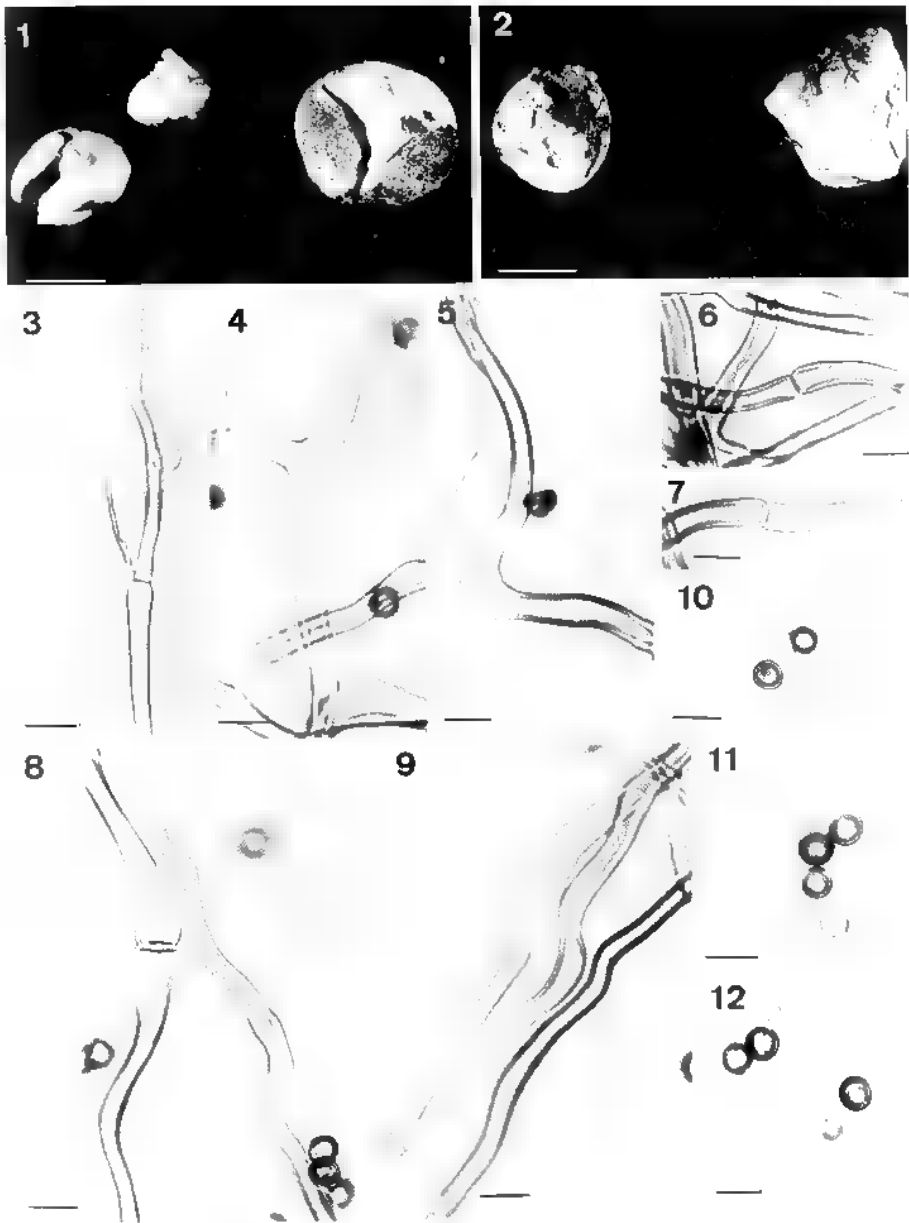
The type material studied of *Calvatia pygmaea* (S) consists of three complete basidiocarps and one fragment, measuring 7.5-10 mm diam. Macro- and microscopic characters coincide with the material from Baja California Sur (Figs. 22-30). This species was known only by the description of the type by Fries (1909), based on specimens from Bolivia and Argentina. This author did not indicate which of the two collections should be considered as type. Therefore we select as lectotype the collection R.E. Fries 65a from Argentina, which plainly coincides with the original diagnosis. The syntype R.E. Fries 77a (S) from Bolivia, one basidiocarp studied by one of us (H.K.) in 1989, has the same characters.

ACKNOWLEDGEMENTS: We wish to express our gratitude to the herbarium S for the loan of type material. The assistance of J.A. Pérez and A. Priego with the SEM has been invaluable. Dr Ochoa wishes to thank to the University of Alcalá de Henares for granting him a Visiting Professorship during 1994. This research has been partially funded by Project DGICYT 95-0129 and by the Programa de Cooperación con Iberoamérica, Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

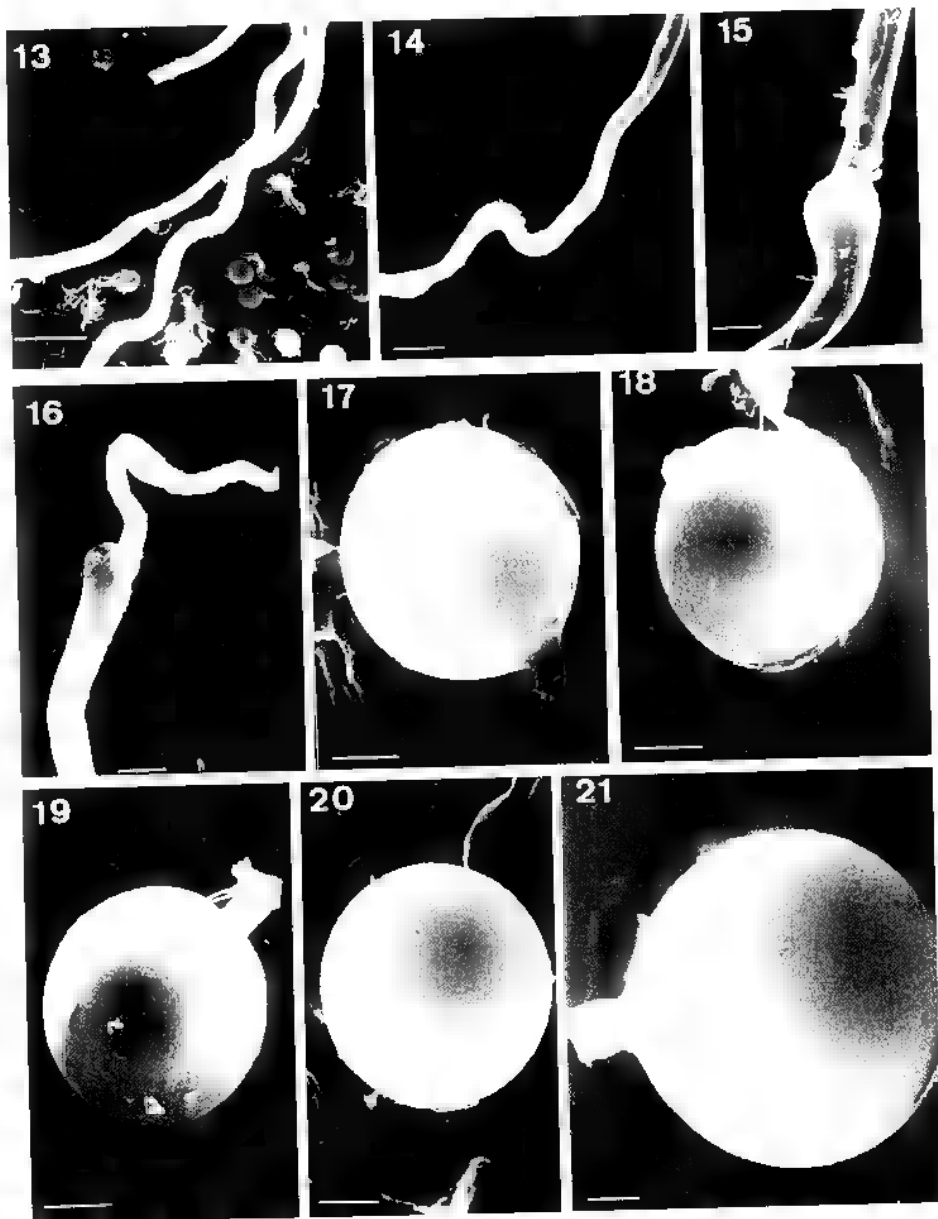
REFERENCES

- BOTTOMLEY, A. M. 1948 — *Gasteromycetes* of South Africa. *Bothalia* 4: 473-810.
 FRIES R.E. 1909 — Über einige Gasteromyceten aus Bolivien und Argentinien. *Arkiv för Botanik* 8 (11): 1-34.

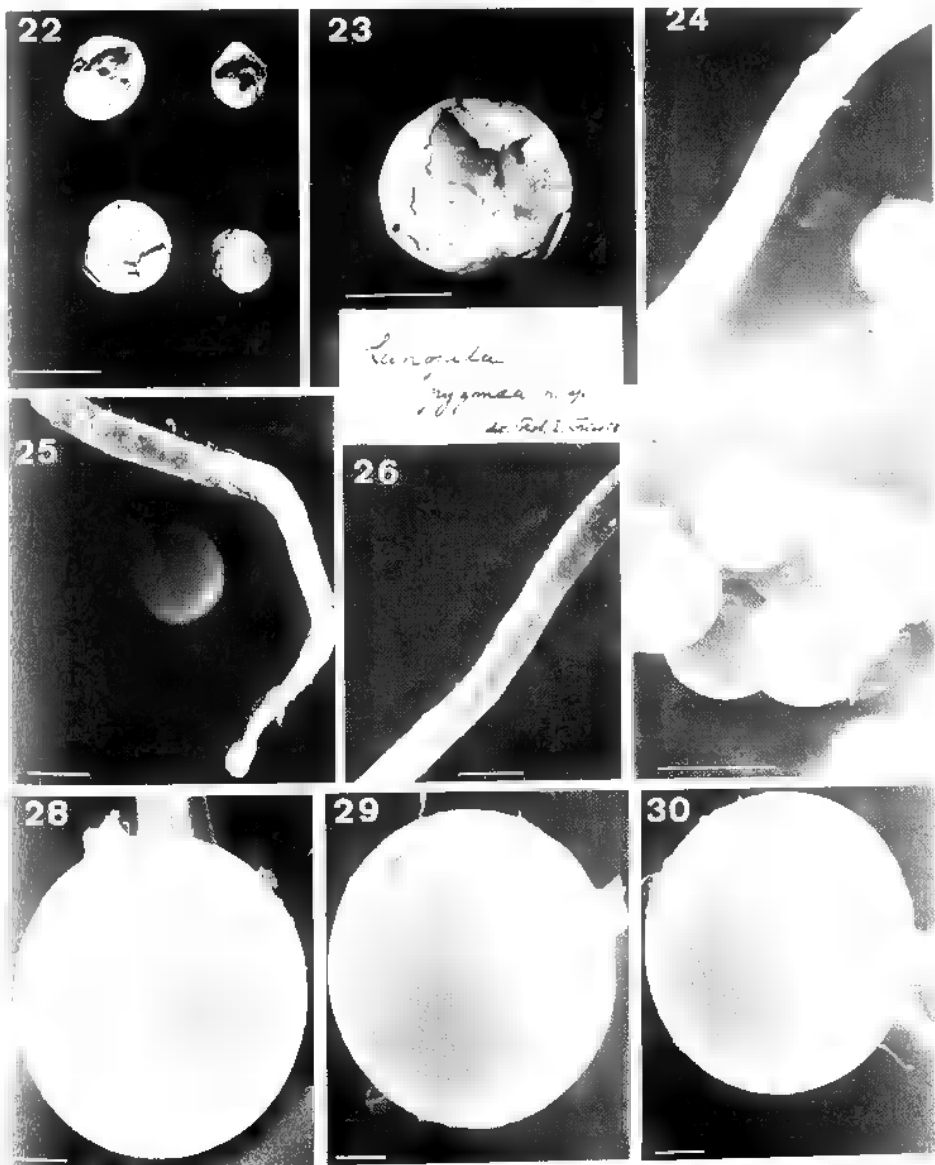
- HARIOT, P. & PATOUILLARD, N. 1904 — Description de Champignons nouveaux de l'Herbier du Museum. *Bulletin de la société mycologique de France* 20: 61-65.
- KREISEL H. 1994 — Studies in the *Calvatia* complex (Basidiomycetes) 2. *Feddes Repertorium* 105: 369-376.
- LOCQUIN M. V. 1975 — *Natural color guide*. Publ. by the author. Sens, France.
- MORENO G., ALTÉS A., OCHOA C. & WRIGHT J.E. 1995 — Contribution to the study of Tulostomataceae in Baja California, Mexico. I. *Mycologia* 87: 96-120.
- MORENO G., KREISEL H. & ALTÉS A. 1996 — *Calvatia complutensis* sp. nov. (Lycoperdaceae, Gasteromycetes) from Spain. *Mycotaxon* 57: 155-162.



Figs. 1-12 — *Calvatia pygmaea*. 1: Basidiocarps (AH 18358). 2: asidiocarps (AH 21501). 3-9: Imperforate capillitium showing septa and ramification (AH 18358). 10-12: Smooth spores (AH 18358). Bars: 1, 2 = 10 mm; 3-12 = 10 μ m.



Figs. 13-21 — *Calvatia pygmaea*. 13-16: Capillitium under SEM with septa (AH 18358). 17-20: Spores smooth under SEM (AH 18358). 21: Spore smooth under SEM (AH 21501). Bars: 13 = 20 μ m; 14 =



10 μ m; 15, 16 = 5 μ m; 17-20 = 2 μ m; 21 = 1 μ m. Figs. 22-30 — *Calvatia pygmaea* R.E. Fries 65a (Lectotype, S). 22-23: Basidiocarps. 24-26: Imperforate capillitium under SEM. 27-30: Spores smooth under SEM. Bars: 22, 23 = 10 mm; 24-26 = 5 mm; 27 = 10 μ m; 28-30 = 2 mm.

LA MACROFLORE FONGIQUE DE *CEDRUS ATLANTICA* (ENDL.) MANETTI EX CARRIERE

II — LES CHAMPIGNONS ECTOMYCORHIZIENS D'UNE CEDRAIE DU MASSIF DU DJURDJURA (ALGERIE)

H. NEZZAR-HOCINE¹, R. J. BOUTEVILLE²,
J. GUINBERTEAU³, R. PERRIN⁴ et G. CHEVALIER^{5*}

¹ Université Mouloud Mammeri, Unité de Recherches en Biologie et Agro-Foresterie,
route de Hasnaoua, 15000 Tizi-Ouzou (Algérie). Fax : (+213) 3 21 86 81.

² 12, rue Jules Guesde, 63400 Chamalières (France).

³ INRA, Station de Recherches sur les champignons, Domaine de la Grande-Ferrade,
71 avenue Edouard Bourleaux, B.P. 81, 33883 Villenave-d'Ornon Cedex (France).
Fax : (+ 33) 5 56 84 31 78. E — mail : guinberteau @ bordeaux.inra.fr.

⁴ INRA, Station de Recherches sur la Flore Pathogène dans le sol, 17 rue Sully, 21031 Dijon Cedex
(France). Fax : (+ 33) 3 80 63 30 26. E — mail : perrin @ bordeaux.inra.fr.

⁵ INRA, Station d'Amélioration des Plantes, Unité de Pathologie végétale et de Mycologie,
Domaine de Crouelle, 63039 Clermont-Ferrand Cedex 2 (France). Fax : (+ 33) 4 73 62 44 59.
E — mail : Chevalier @ clermont.inra.fr.

RÉSUMÉ — Les données sur les champignons mycorrhiziens du cèdre de l'Atlas sont rares. Une étude a été réalisée à la cèdraie d'Ighil-Inguel, station de Tala-Guilef (massif du Djurdjura, Algérie). Une attention particulière a été accordée aux champignons mycorrhiziens susceptibles de contracter une association avec le cèdre au stade juvénile. Sur une centaine d'espèces identifiées (appartenant à 48 genres), 71 espèces appartenant à 29 genres sont connues comme ectomycorhiziennes ; la plupart font partie des familles des *Cortinariaceae*, *Tricholomataceae* et *Russulaceae*. Sur les 71 espèces, 40 sont signalées pour la première fois en Algérie. Parmi les 193 espèces mycorrhiziennes différentes élevées en Algérie, au Maroc et en France, dans les différentes études réalisées jusqu'ici, 23 espèces trouvées au cours de notre étude sont signalées pour la première fois sous cèdre. La flore mycorrhizienne du cèdre de l'Atlas semble correspondre principalement aux genres *Cortinarius*, *Inocybe*, *Russula* et *Tricholoma*. Les genres *Hebeloma*, *Hygrophorus* and *Ramaria* sont assez bien représentés.

MOTS CLEFS — mycorrhiziens, Algérie, *Cedrus*

SUMMARY — Information about mycorrhizal fungi associated with *Cedrus atlantica* is scarce. The appearance of fruit bodies was monitored in the *C. atlantica* forest of Ighil-Inguel (Tala-Guilef station, Djurdjura mountains, Algeria). Particular attention was paid to those mycorrhizal fungi able to initiate a symbiotic association with young cedar. Of about a hundred fungal species identified

* Auteur correspondant

(corresponding to 48 different genera), 71 species belonging to 29 genera are ectomycorrhizal. Most of them are members of the *Cortinariaceae*, *Tricholomataceae* and *Russulaceae* families. Out of the 71 species, 40 were observed for the first time in Algeria. Out of the 193 mycorrhizal species observed in Algeria, Morocco and France, in the different studies made so far, 23 were monitored for the first time in this study under cedar. The mycorrhizal flora of *Cedrus atlantica* appears to consist mainly of species belonging to genera *Cortinarius*, *Inocybe*, *Russula* and *Tricholoma*. The genera *Hebeloma*, *Hygrophorus* and *Ramaria* are also represented.

KEY WORDS — mycorrhizal, Algeria, *Cedrus*

INTRODUCTION

Compte tenu de l'importance de la symbiose mycorhizienne pour les essences forestières, de nombreux chercheurs, tels Trappe (1962), Singer (1975), Müller (1982a et b), Harley & Smith (1983), ont établi des listes de champignons mycorhiziens associés à différentes essences. Ces listes ont été constituées à partir d'observations effectuées directement sur le terrain ou de travaux de synthèse au laboratoire. Le recensement mycologique d'un peuplement donné permet d'inventorier les champignons saprophytes, parasites et mycorhiziens. En éliminant les saprophytes et les parasites, on peut dresser une liste des espèces mycorhiziennes pour une plante-hôte donnée. Cette étape est très importante dans l'élaboration d'un programme de mycorhization contrôlée, car elle permet de disposer d'isolats qui serviront à sélectionner les associations mycorhiziennes les plus intéressantes pour le développement de la plante.

Les données concernant les champignons mycorhiziens associés au cèdre de l'Atlas sont rares. Dans les différents travaux réalisés sur la macroflore du cèdre de l'Atlas, aussi bien au Maroc (Maire & Werner, 1937; Malençon & Bertault, 1970b, 1975; Bertault, 1964, 1965, 1978a et b), qu'en Algérie (Maire, 1914, 1927; Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b) et en France (Coulon & Rioussset 1967; Mousain, *in* Toth, 1988; Rioussset & Rioussset, 1991), le caractère mycorhizien des espèces n'est pas mentionné; seules sont signalées les espèces caractéristiques d'une station déterminée ou spécifiques du cèdre.

Le Poutre (1961), dans son étude sur les conditions édaphiques de la régénération des cédraies marocaines, ne mentionne le caractère mycorhizogène que de cinq espèces. Dans une synthèse bibliographique établie en 1962, et concernant 280 espèces d'arbres, Trappe cite 525 espèces de champignons susceptibles d'être ectomycorhiziens; 5 seulement concernent le cèdre de l'Atlas, dont 4 espèces déjà citées par Le Poutre. Dans une étude bibliographique sur les champignons mycorhiziens des conifères de France, Pradon (1994) mentionne seulement 5 espèces de champignons mycorhiziens sous *Cedrus*. Le nombre de champignons cités dans l'ensemble des travaux effectués jusqu'ici reste donc très limité. Dans la synthèse bibliographique de Meyer (1973), le cèdre de l'Atlas n'est pas mentionné parmi les essences à ectomycorhizes les plus importantes dans le bassin méditerranéen.

Jusqu'à présent, aucune étude approfondie n'avait été entreprise sur les champignons mycorhiziens des cédraies algériennes. Les premiers travaux sur la symbiose mycorhizienne du cèdre de l'Atlas dans le massif du Djurdjura (Algérie), effectués par Hocine *et al.* (1990, 1994), ont montré une grande richesse de la macroflore fongique, une large diversité des types mycorhiziens et un potentiel ectomycorhizien du sol de cédraie très élevé (Nezzar-Hocine *et al.*, 1995). L'objectif de cet article est, d'une part de faire un

inventaire des champignons mycorhiziens d'une cédraie représentative d'Algérie, d'autre part d'établir une comparaison avec l'ensemble des champignons mycorhiziens répertoriés sous le cèdre de l'Atlas, aussi bien dans son aire d'origine (Algérie, Maroc) qu'en France.

MATERIEL ET METHODES

1. Site d'étude et époque de prélèvement

Les champignons mycorhiziens ont été récoltés dans la cédraie d'Ighil-Inguel (station de Tala-Guilef), à 1600 m d'altitude, dans un site qui a été consacré spécialement à l'étude de la macroflore fongique (Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b). La description détaillée de ce site a été donnée par Nezzar-Hocine *et al.* (1996b). La station de Tala-Guilef (1450 mètres d'altitude moyenne) se caractérise par un climat méditerranéen à variante froide et humide. Les caractéristiques climatiques de la station ont été fournies par Abdesselam (1995).

Les relevés de champignons ont été effectués sur environ un hectare, de part et d'autre de la ligne des crêtes dite « des millénaires » qui sépare les versants nord et sud de la cédraie. Les versants sont caractérisés par des peuplements très diversifiés, depuis de jeunes régénérations jusqu'à des arbres dits « millénaires ». En réalité ces arbres n'ont pas mille ans, mais de 400 à 450 ans (Toth, comm. pers.), si l'on se réfère aux mêmes spécimens existant au Maroc. La collecte des champignons a été faite durant 4 années consécutives, à raison de deux sorties par saison, de l'automne 1989 au printemps 1993.

2. Identification des champignons

Les champignons mycorhiziens ont été identifiés par l'examen des caractères macroscopiques des sporophores, d'après les principaux ouvrages de Maire (1928), Malençon & Bertault (1970b, 1975), de Bertault (1978a et b), ainsi que ceux de Kühner & Romagnesi (1974) et de Bon (1984, 1991). Des études microscopiques ont été réalisées sur les revêtements et les spores des échantillons appartenant à des genres ou complexes spécifiques renfermant des espèces difficiles à séparer (*Cortinarius*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Russula*...). La classification et la nomenclature des espèces sont celles adoptées par Courtecuisse (1994). Nous avons également utilisé la liste des noms valides de Berteaux *et al.* (1989).

RESULTATS

1. Inventaire des espèces mycorhiziennes

L'inventaire de la macroflore fongique de la cédraie d'Ighil-Inguel a révélé une grande richesse en espèces mycorhiziennes. Sur une centaine d'espèces identifiées réparties en 48 genres (Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b), au total 71 espèces sont susceptibles d'être mycorhiziennes (tableaux 1 et 3).

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Autres régions	Moyen Atlas Rif. Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
Amanitaceae							
Amanita							
<i>A. ceciliae</i> (Bk. & Br.) Boudier ex. Bas (<i>A. inaurata</i> = <i>A. strangulata</i>)				B			
<i>A. gemmata</i> (Paulet) Bertillon				B, M & B			
<i>A. gemmata</i> f. <i>amici</i> (Gill.) Gilb.				M & B			
<i>A. muscaria</i> (L. : Fr.) Hook.				B, M & B			Durt.
<i>A. ovoidea</i> (Bull. : Fr.) Link	L						
<i>A. rubescens</i> (Pers. : Fr.) S. F. Gray		G	M & B	M & B			
<i>A. vaginata</i> (Bull. : Fr.) Vitt.	L	G					
Bankeraceae							
Hydnellum							
<i>H. ferrugineum</i> (Fr. : Fr.) Karsten (= <i>Calodon</i> f.)					R		
Boletaceae							
Boletus							
<i>B. erythropus</i> Pers. (= <i>Tubiporus</i> e.)	C, Te L	G		M & W			
<i>B. luridus</i> Sch. : Fr.	L						L
Chalciporus							
<i>C. amarellus</i> (Quéf.) Bataille (= <i>Boletus</i> a.)		G					
Leccinum							
<i>L. crocipodium</i> (Letellier) Watl. (= <i>L. tessellatum</i> = <i>L. nigrescens</i>) (= <i>Boletus crocipodius</i>)	■	■					
Suillus							
<i>S. collinitus</i> (Fr.) O. Kuntze (= <i>S. fluryi</i> = <i>B. collinitus</i>)	L	G					L
<i>S. luteus</i> (L. : Fr.) Roussel						M	L
<i>S. placidus</i> (Bonorden) Sing.		G					
Xerocomus							
<i>X. chrysenteron</i> (Bull.) Quéf.	C, e L	G			M		L, Durt.
<i>X. subtomentosus</i> (L. : Fr.) Quéf. (= <i>Boletus subtomentosus</i> L. : Fr.)	C, L			M & B			
Clavariadelphaceae							
Clavariadelphus							
<i>C. truncatus</i> (Quéf.) Donk (= <i>Clavaria truncata</i> Quéf.)	C			M & W			
Clavulinaceae							
Clavulina							
<i>C. cristata</i> (Holmsk. : Fr.) Schroet. (= <i>Clavaria</i> c. Holmsk. : Fr.) (= <i>Ramaria</i> c.)	L						
Cortinariaceae							
Cortinarius							
<i>C. anserinus</i> (Vel.) Henry (= <i>C. amoenolens</i>)				M & W M & B			
<i>C. anomalus</i> (Fr. : Fr.) Fr.				M & W			
<i>C. aurasiacus</i> ***Pat. ss. Malç. & Bert.	C			M & W, M & B			
<i>C. argentatus</i> (Pers. : Fr.) Fr.				M & B			
<i>C. azureus</i> Fr.				M & W, M & B			
<i>C. brunneus</i> (Pers. : Fr.) Fr.	C		M & B	M & W			
<i>C. caeruleus</i> (Sch.) Fr.			Maire in M & B				
<i>C. calochrous</i> (Pers. : Fr.) S.F. Gray		G				M	
<i>C. calochrous</i> f. <i>violascens</i> Henry				M & B			

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Autres régions	Moyen Atlas, Rif, Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
Cortinarius							
<i>C. candelaris</i> Fr.				M & B			
<i>C. castaneus</i> (Bull. : Fr.) Fr.		Ω					
<i>C. cedretorum</i> ***Maire	C, T, L	G	M & B	M & W M & B, P			
<i>C. cedretorum</i> ***Maire var. <i>typicus</i> Maire				M & W			
<i>C. claricolor</i> (Fr.) Fr.	C, T			M & W			
<i>C. cotoneus</i> Fr.			M & B				
<i>C. duracinus</i> Fr.	C, T	G	M & B	M & W, M & B			
<i>C. dionysae</i> Henry.				M & B			
<i>C. elegantissimus</i> Henry (= <i>C. auroturbinatus</i> pp.)		Ω					
<i>C. glaucopus</i> (Sch : Fr) Fr.			M & B				
<i>C. herculeus</i> ***Malençon		Ω		M & B, P	M, R	■	L. Durr.
<i>C. infractus</i> (Pers. : Fr.) Fr.	C, T		M & B	M & B	R		
<i>C. infractus</i> (Pers. : Fr.) Fr. ssp. <i>obscurocyaneus</i> p. Secretan ex Schroeter) garnier			Maire in M & B	M & B			
<i>C. multiformis</i> (Fr. →) Fr.				M & B			
<i>C. ochropallidus</i> Henry				M & B			
<i>C. odorifer</i> Britz.		G	M & B	M & B			
<i>C. orichalceus</i> (Batsch) Fr.	C			M & B			
<i>C. prasinus</i> (Sch.) Fr.				M & B			
<i>C. sodagnitus</i> Henry				M & B			
<i>C. turmalis</i> Fr. var. <i>cedretorum</i> Heim				Heim, in M & B			
<i>C. uraceus</i> Fr.				M & B			
<i>C. varicolor</i> (Pers. : Fr.) Fr.				M & B			
<i>C. venetus</i> (Fr.) Fr.				M & B			
Galerina							
<i>G. badipes</i> (Fr.) Kühn.			M & B	M & B			
<i>G. cedretorum</i> ***Maire (Singer)	C						
Hebeloma							
<i>H. crustuliniforme</i> (Bull.) Quéf.		Ω					
<i>H. eburneum</i> *** Malençon		Ω		M & B	R	M	
<i>H. edurum</i> Métr. & Bon		Ω					
<i>H. fastibile</i> (Pers. : Fr.) Kumm. (= <i>H. sordidum</i> Maire)	C, T	G	M & B	M & W, M & B		Bridau	
<i>H. mesophaeum</i> (Pers.) Quéf.		Ω		M & B		M	
<i>H. pallidum</i> Malençon				M & B			
<i>H. sinapizans</i> (Paulet) Gill.		Ω		M & B	M	M	L.
<i>H. strophosum</i> (Fr.) Sacc. ss Lange				M & B			
<i>H. versipelle</i> (Fr.) Gill.		Ω		M & B			
Inocybe							
<i>I. aurantiifolia</i> *** Beller		Ω			R		
<i>I. brunnea</i> Quéf.				M & B			
<i>I. dolichospora</i> Malençon				M & B			
<i>I. geophylla</i> (Fr. : Fr.) Kumm.	C		M & B	M & B	R		
<i>I. gramimopodia</i> Malençon				M & B			
<i>I. hirtella</i> Bres.	C		M & B				
<i>I. kuehneri</i> St. & Ves. (= <i>I. euiheles</i> (Berk. & Br.) Quéf.)		Ω					
<i>I. lucifuga</i> (Fr. : Fr.) Kumm.	C						
<i>I. nitidiuscula</i> (Britz.) Sacc. (= <i>I. friesii</i> Heim)		Ω					
<i>I. leptocystis</i> Atk.		Ω					

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Autres régions	Moyen Atlas, Rif, Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
<i>Inocybe</i>							
<i>I. orbata</i> Malençon				M & B			
<i>I. pisciodora</i> Donad. & Riouss.					R		
<i>I. queletii</i> Konr.			M & B	M & W M & B			
<i>I. rufula</i> Malençon				M & B			
<i>I. rimosa</i> (Bull. : Fr.) Kumm. (= <i>I. fastigiata</i> (Sch.) Quél.)	C.T	G	M & B				
<i>I. roseipes</i> Malençon				M & B			
<i>I. sambucina</i> (Fr. : Fr.) Quél.				M & B			
<i>I. scabelliformis</i> *** Malençon				M & B			
<i>I. subbrunnea</i> Kühn.		G					
<i>I. tenebrosa</i> Quél.					R		
<i>I. tristis</i> Malç. & Bert.				M & B			
<i>I. xanthodisca</i> Kühn.					R		
Gautieraceae							
<i>Gautiera</i>							
<i>G. pseudovestita</i> Malençon				M & B			
<i>G. trabutii</i> *** (Chatin) Pat.	Pal. C			M & W, M & B			
Geastraceae							
<i>Geastrum</i>							
<i>G. coronatum</i> Pers. : Pers. (= <i>G. limbatum</i> Fr.)							Guin.
<i>G. melanocephalum</i> (Czern.) Stanek f. <i>melanocephalum</i> (= <i>Trichaster melanocephalum</i> Czern.)					R		
<i>Geaster</i>							
<i>G. triplex</i> Junghuhn		G		M & B	R		
<i>G. berkeleyi</i> Massee	L						
<i>G. sessile</i> (Sow.) Pouz. (= <i>G. fimbriatum</i>)					R, M		L
Gomphaceae							
<i>Gomphus</i>							
<i>G. clavatus</i> (Pers. : Fr.) S.F. Gray (= <i>Nevrophyllum clavatum</i>)		G		M & B			
<i>G. crassipes</i> (Duf.) Maire (= <i>Cantharellus crassipes</i> Duf.)	Duf. T.			M & W, M & B			For. et Nev.
Gomphidiaceae							
<i>Chroogomphus</i>							
<i>C. rutilus</i> (Sch. : Fr.) O.K. Mill.						M	
Helvellaceae							
<i>Paxina</i>							
<i>P. acetabulum</i> (L. Fr.) O. Kuntze (= <i>Acetabula vulgaris</i> = <i>Helvella a.</i>)		G		M & W			
Hygrophoraceae							
<i>Cuphophyllum</i>							
<i>C. virgineus</i> (Wulf. : Fr.) Kovalenko (= <i>C. niveus</i> = <i>Hygrophorus n.</i>)		M.		M & B	M & B		
<i>Hygrocybe</i>							
<i>H. conicus</i> (Scop. : Fr.) Kummer						M	
<i>H. fornicata</i> (Fr.) Sing.					R		
<i>H. persistens</i> (Britz.) Sing. (= <i>H. acutoconicus</i> var <i>langei</i> (Kühner) M. Bon)				M & B			

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellia	Djurdjura	Autres régions	Moyen Atlas, Rif, Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
Hygrophorus							
<i>H. carneogriseus</i> Malençon			Maire in M & B	M & B		M	
<i>H. chrysodon</i> (Batsch : Fr.) Fr.	C, T	G					
<i>H. conicus</i> Scop. : Fr.					M		
<i>H. eburneus</i> (Bull. : Fr.) Fr.	L	G					
<i>H. eburneus</i> (Bull. : Fr.) Fr. var. <i>coscus</i> (Sow. : Fr.) Quélet	T						
<i>H. marzuolus</i> (Fr. : Fr) Bres.				M & B			Bok & Mor. in Trap. Kraft. in Trap.
<i>H. persoonii</i> Arnolds (= <i>H. dichrous</i>)				M & B			
<i>H. pudorinus</i> (Fr. : Fr.) Fr.	L						
<i>H. purpurascens</i> (Alb. & Schw. : Fr.) Fr.	C, T		M & B	M & w M & B			
<i>H. purpurascens</i> var. <i>cedretorum</i> *** Maire	C						
<i>H. russula</i> (Sch. : Fr.) Quélet. var. <i>cedretorum</i> ***Maire		G					
Hymenogastraceae							
Hymenogaster							
<i>H. bulliardii</i> Vitt.					R		
Hysterangiaceae							
Hysterangium							
<i>H. rickeni</i> Soncher				M & B			
Melanogasteraceae							
Melanogaster							
<i>M. broomeanus</i> (Berk.) Tul.					R		
<i>M. ambiguus</i> (Vitt.) Tul.					R		
Morchellaceae							
Morchella							
<i>M. conica</i> Pers. : Fr.	T			M & w			
<i>M. costata</i> (Vent.) Pers.	T, c	G		M & w			
<i>M. intermedia</i> Boud.					R		
<i>M. rigida</i> (Krombl.) Bond.		Maire					
<i>M. umbrina</i> Boudier		Maire					
<i>M. elata</i> Fr. : Fr.				M & w			
Otidea							
Otidea							
<i>O. onotica</i> (Pers. : Fr.) Fuckel						M	
Tarzetta							
<i>T. catinus</i> (Holmskj. : Fr.) Korf & Rogers (= <i>Pustularia c.</i>) (= <i>P. ochracea</i>)	C						
Hypotarzetta							
<i>H. insignis</i> (Berthet & Riouss.) Donad. (= <i>Pustularia i.</i>) (= <i>Tarzetta i.</i>)	C			M & B (1970)	R		
Pisolithaceae							
Pisolithus							
<i>P. arrhizus</i> (Scop.) S. Rauber (= <i>P. tinctorius</i> (Pers.) Desm.)		G					
Pezizaceae							
Sarcosphaera							
<i>S. crassa</i> (Santi & Steudel) Pouzar (= <i>S. coronaria</i>)		G					

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Autres régions	Moyen Atlas, Rif, Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
Pyrenomataceae							
Geopora							
<i>G. sumneriana</i> *** (Cooke) De la Torre (= <i>Sepultaria</i> s.)	Pal, C, T, L	G		M & W	R		L, Dur.
Ramariaceae							
Ramaria							
<i>R. cedretorum</i> *** (Maire) Malençon (= <i>Clavariella</i> c.) (= <i>C. cedretorum</i> var. <i>eucedretorum</i> Werner)	C			M & B, P.			
<i>R. aurea</i> (Sch.) Quél (= <i>Clavaria aurea</i>)	C	G		M & W			
<i>R. botrytis</i> (Pers. : Fr.) Rick. (= <i>Clavaria botrytis</i>)	u, L	■		M & W			
<i>R. flaccida</i> (Fr. : Fr.) (= <i>Clavaria</i> f.)					R		
<i>R. flava</i> (Sch. : Fr.) Quél. (= <i>Clavaria</i> f.) (= <i>R. flavicolor</i>) (= <i>Clavariella</i> f.)	C, c	G					
<i>R. formosa</i> (Pers. : Fr.) Quél. (= <i>Clavaria</i> f.)	Pal, C, T, c	G		M & B			
<i>R. mairei</i> Donk (= <i>R. pallida</i>)				M & W			
<i>R. myceliosa</i> (Peck.) Corn. (= <i>Clavaria corrugata</i> Karst.)					R		
<i>R. nigrescens</i> (Brinkm.) Donk					R		
<i>R. ochraceovirens</i> (Junghuhn) Donk (= <i>R. abietina</i> auct. pp.)				M & W	R		
Rhizopogonaceae							
Rhizopogon							
<i>R. vulgaris</i> (Vitt.) Lange M. (= <i>R. provincialis</i> Tul.)	M & B	G		M & B			
Russulaceae							
Lactarius							
<i>L. chrysorrhoeus</i> Fr.					M		
<i>L. fuliginosus</i> (Fr. : Fr.) Fr.							L
<i>L. mitissimus</i> (Fr. : Fr.) Fr.		Q		B			
<i>L. vellereus</i> (Fr. : Fr.) Fr.		G					
<i>L. sanguifluus</i> (Paul. : Fr.) Fr.	L					M	L
Russula							
<i>R. acrifolia</i> Romagn.				■			
<i>R. adusta</i> (Pers. : Fr.) Fr.	C			■		M	L
<i>R. alutacea</i> (Pers. : Fr.) Fr. var. <i>brunneola</i> Bert.		■					
<i>R. albonigra</i> (Krombh.) Fr.				B			
<i>R. amara</i> Kucera (= <i>R. caerulea</i>)	C						
<i>R. anthracina</i> Romagn. var. <i>carneifolia</i> Romagn.				B			
<i>R. azurea</i> Bres.		Q		B			
<i>R. delicata</i> Fr.	C, L	G				M	L
<i>R. densifolia</i> (Secr.) ex. Gill.				B			
<i>R. grisea</i> (Pers.) Fr.	C						
<i>R. integra</i> (L.) Fr (= <i>R. polychroma</i> Sing. ex. Hora)	C						
<i>R. krombholzii</i> R. Shaffer (= <i>R. atropurpurea</i>)	L	G					L
<i>R. nigricans</i> (Bull. →) Fr.		G					
<i>R. ochroleuca</i> (Hall.) Pers.		G					
<i>R. drimeia</i> Cooke (= <i>R. cf. sardonica</i>)						M	
<i>R. subfoetens</i> W. G. Smith		G					
<i>R. sublaevispora</i> (Romagn.) Romagn. ex. Bon				B			
<i>R. subterfucata</i> Romagn. (= <i>R. basifurcata</i>)				B			
<i>R. torulosa</i> Bres.		Q			■		

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Régions non précisées	Moyen Atlas, Rif, Autres régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres régions
<i>Russula</i>							
<i>R. turci</i> Bres.	Pal., C, T, M & B	G		■			
<i>Sarcoscyphaceae</i> <i>Neourula</i>							
<i>N. pouchetti</i> (Berthet & Riousset) Paden (= <i>Urnula</i> p.)					R		
<i>Sclerodermataceae</i> <i>Scleroderma</i>							
<i>S. verrucosum</i> (Bull. : Pers.) Pers.	M & B	G		M & B			
<i>Strobilomycetaceae</i> <i>Strobilomyces</i>							
<i>S. strobilaceus</i> (Scop. : Fr.) Berk. (= <i>S. floccopus</i>)		G					
<i>Thelephoraceae</i> <i>Boletopsis</i>							
<i>B. leucomelaena</i> (Pers.) Fayod		G		M & W	R, M	M	
<i>B. grisea</i> (Peck) Bond. & Sing. (= <i>Polyporus griseus</i> Peck)				M & B, P			
<i>Tuberaceae</i> <i>Tuber</i>							
<i>T. stirpe borchii</i> Vitt.		G					
<i>T. borchii</i> Vitt.					R		
<i>T. maculatum</i> Vitt.					R		
<i>T. nitidum</i> Vitt.					R		
<i>Tricholomataceae</i> <i>Callistosporium</i>							
<i>C. olivascens</i> (Boudier) Bon							Prad.
<i>Laccaria</i>							
<i>L. laccata</i> (Scop. : Fr.) Cooke	C, T	G					
<i>Lyophyllum</i>							
<i>L. decastes</i> (Fr. : Fr.) Sing. (= <i>L. aggregatum</i> ss. lato) (= <i>L. aggregatum</i> f. <i>typicus</i> Kühn. & Romagn.)		G	M & B	M & B		M	
<i>L. deliberatum</i> (Britz) Kreis. (= <i>L. infumatum</i> (Bres.) Kühn.)		G	M & B	M & B		M	
<i>L. fumosum</i> (Pers. : Fr.) Kühn. & Romagn. ex Orton (= <i>L. aggregatum</i> var. <i>fumosum</i>) (= <i>L. cinerascens</i>)		G					
<i>L. semitale</i> (Fr.) Kühn.				M & B			
<i>T. ozes</i> Kühn. & Romagn.				M & B			
<i>Rugosomyces</i>							
<i>R. onychinum</i> (Fr.) Raith.			M & B	M & B			
<i>R. cerinus</i> (Pers. : Fr.) Bon	C						
<i>Tephrocycbe</i>							
<i>T. anthracophila</i> (Lasch) Orton (= <i>Lyophyllum carbonarium</i>)				M & B			
<i>T. ozes</i> (Fr.)				M & B			
<i>Tricholoma</i>							
<i>T. alboconicum</i> Lange					R		
<i>T. auratum</i> Gill. (<i>T. equestre</i> pp)			M & B	M & W M & B			
<i>T. atrosquamosum</i> (Chev. →) Sacc.			M & B	M & B			
<i>T. caligatum</i> (Viv.) Rick.	C	G	M & B	M & W M & B Abou.			

Familles / genres / espèces	ALGERIE			MAROC	FRANCE		
	Atlas tellien	Djurdjura	Autres Régions	Moyen Atlas, Rif, Autres Régions	Petit-Lubéron	Mont-Ventoux	Autres Régions
<i>Tricholoma</i>							
<i>T. cedrorum</i> *** Maire	C, c			M & W M & B			
<i>T. equestre</i> (L. : Fr.) Kumm. (= <i>T. flavovirens</i>)	C, T		M & B	M & W			
<i>T. fulvum</i> (Bull. : Fr.) Saccardo (= <i>T. flavobrunneum</i> (Fr.) Kumm.)		G					
<i>T. gausapatum</i> (Fr. : Fr.) Quéf.	C, T						
<i>T. josserandii</i> Bon (= <i>T. groanense</i> Viola)		G			■		
<i>T. orirubens</i> Quéf.			M & B	M & B			
<i>T. pessundatum</i> (Fr. : Fr.) Quéf.				M & W, P M & B			L
<i>T. portentosum</i> (Fr. : Fr.) Quéf.	C M & B	G					
<i>T. pseudonictitans</i> Bon		G					
<i>T. saponaceum</i> (Fr. : Fr.) Kumm.	C	G		M & B	M	M	
<i>T. saponaceum</i> (Fr. : Fr.) Kumm f. <i>nympharum</i>				M & B			
<i>T. squarrulosum</i> Bres.	C			M & W			
<i>T. stans</i> (Fr.) Sacc.	C						
<i>T. ustale</i> (Fr. : Fr.) Kumm.	T						
<i>T. terreum</i> (Sch. : Fr.) Kumm.	C, c	G	M & B	M & B	R	M	L
<i>T. tridentinum</i> *** Sing. var. <i>cedretorum</i> Bon		G			R, M	M	Durr.
<i>Fungi imperfecti</i>							
<i>Cenococcum graniforme</i> (Sow.) Ferd. & Wing. (= <i>C. geophilum</i>)		G		Abou			

Tableau 1 : Champignons présumés ectomycorhiziens, récoltés sous *Cedrus atlantica*.

1 — Cédraies d'Algérie — Atlas tellien : C, T, Maire (1914, 1927, 1928) (C : Chréa ; T : Teniet-El-Had) ; c, M.A.R.A. (1992) (Chréa) ; Duf., Dufour (1889) (Teniet-El-Had) ; L, Lanier (1994) (Chréa) ; M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975) ; Pat., Patouillard (1897, 1903, in Maire, 1914) — Djurdjura : G, Nezzar-Hocine *et al.* (1996b), Maire (1927) ; — Autres régions : M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975).

2 — Cédraies du Maroc — Abou., Abourouh (1990, 1995) ; B, Bertault (1964, 1965, 1978a) ; M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975) ; M & W, Maire & Werner (1937) ; P, Le Poutre (1961).

3 — Cédraies de France — Petit-Lubéron : R, Rioussat & Rioussat (1991) ; M, Mousain (comm. pers.) — Mont-Ventoux : M, Mousain (in Toth, 1988) ; Bidaud (1990) — Autres régions : Bokor & Mor., Bokor & Moreau (1962, in Trappe, 1964) ; Durr., Durrieu (comm. pers.) For. et Nev., Forte & Neville (1994) ; Guin., Guinberteau (comm. pers.) ; Krafi (1962 in Trappe, 1964) ; L, Lanier (1994) ; Prad., Pradon (1994).

*** : espèces spécifiques.

soulignées : espèces signalées pour la première fois en Algérie.

en caractères gras et soulignées : espèces signalées pour la première fois en Algérie et ne figurant dans aucun inventaire des champignons des cédraies.

Sur les 48 genres inventoriés (Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b), 31 se retrouvent dans la liste donnée par Trappe (1962), 21 dans celle de Miller (1982a et b), 23 dans celle de Harley & Smith (1983) et 20 dans celle de Mosse *et al.* (1981). Quelques genres (*Agaricus*, *Calvatia*, *Lycoperdon*, *Clitocybe*) cités par ces auteurs ont, par la suite, été reconnus comme non mycorrhiziens. Sans tenir compte de la liste de Trappe, qui renferme de nombreux genres qui n'ont pas été retenus comme mycorrhiziens, au total 29 genres sur 48 sont donc susceptibles de l'être : 24 d'après les listes de Miller, Harley & Smith et Mosse *et al.*, plus 5 d'après Guinberteau (comm. pers.) : *Chalciporus*, *Gomphus*, *Morchella*, *Paxina*, *Sarcosphaera*. Les listes de Miller, Harley & Smith et Mosse *et al.* ont 17 genres en commun. La majorité des espèces appartiennent à la classe des Homobasidiomycètes, avec 13 ordres et 20 familles. La famille des *Boletaceae* comprend le plus grand nombre de genres (5) ; 3 appartiennent aux *Cortinariaceae* et aux *Tricholomataceae* ; les autres familles ne renferment que 1 à 2 genres. Le plus grand nombre d'espèces observées a été relevé chez les *Cortinariaceae* (20 espèces), les *Tricholomataceae* (12 espèces) et les *Russulaceae* (11 espèces). La répartition des espèces par famille et par genre est représentée dans la figure 1.

Parmi les 71 espèces mycorrhiziennes de la cédraie, un grand nombre sont comestibles, telles : *Hygrophorus chrysodon*, *H. russula*, *Morchella costata*, *Ramaria botrytis*, *R. flava*, *Russula delicata*, *R. alutacea*, *Paxina acetabulum*, *Sarcosphaera crassa*, *Tricholoma portentosum*, « merveilleux comestible » selon Marchand (1971), *T. terreum*, *T. caligatum*. Cette dernière espèce est très voisine du « Matsu-take », sinon identique (Durrieu, 1993) ; les Japonais récoltaient, il y a peu de temps encore, dans la cédraie d'Ighil-Inguel, *T. caligatum* qu'ils appréciaient beaucoup.

2. Espèces mycorrhiziennes spécifiques du cèdre

La cédraie d'Ighil-Inguel présente une grande richesse en espèces mycorrhiziennes spécifiques du cèdre. Nous en avons rencontré 8, sur un total de 18 espèces réputées spécifiques, dont 15 mycorrhiziennes (tableau 1). Des espèces comme *Cortinarius cedretorum*, absent dans les inventaires effectués en France, *Inocybe aurantifolia*, cité par Rioussset,

Table 1: Fungal species collected under *Cedrus atlantica* which have been reported as ectomycorrhizal.

1 — Algeria Atlas cedar forests — Tellien Atlas : C, T. Maire (1914, 1927, 1928) (C : Chréa ; T : Teniet-El-Had) ; c, M.A.R.A. (1992) (Chréa) ; Duf., Dufour (1889) (Teniet-El-Had) ; L, Lanier (1994) (Chréa) ; M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975) ; Pat., Patouillard (1897, 1903, *in* Maire, 1914) — Djurdjura : G, Nezzar-Hocine *et al.* (1996b) ; Maire (1927) — The others localizations : M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975).

2 — Morocco Atlas cedar forests — Abou., Abourouh (1990, 1995) ; B. Bertault (1964, 1965, 1978a) ; M & B, Malençon & Bertault (1970b, 1975) ; M & W, Maire & Werner (1937) ; P, Le Poutre (1961).

3 — French Atlas cedar forests — Petit-Lubéron : R, Rioussset & Rioussset (1991) ; M, Mousain (pers. comm.) — Mont-Ventoux : M, Mousain (*in* Toth, 1988) — The others localizations : Bidaud (1990) ; Björ. & Mor., Björkman & Moreau (1962, *in* Trappe, 1964) ; Durrieu (pers. comm.) For. & Nev., Forte & Neville (1994) ; Guin, Guinberteau (pers. comm.) ; Kraft (1962 *in* Trappe, 1964) ; L, Lanier (1994) ; Grad., Pradon (1994).

*** : specific species

underlined : species reported for the first time in Algeria.

in heavy type and underlined : species reported for the first time in Algeria and never previously mentioned in mycological surveys of Atlas cedar forests.

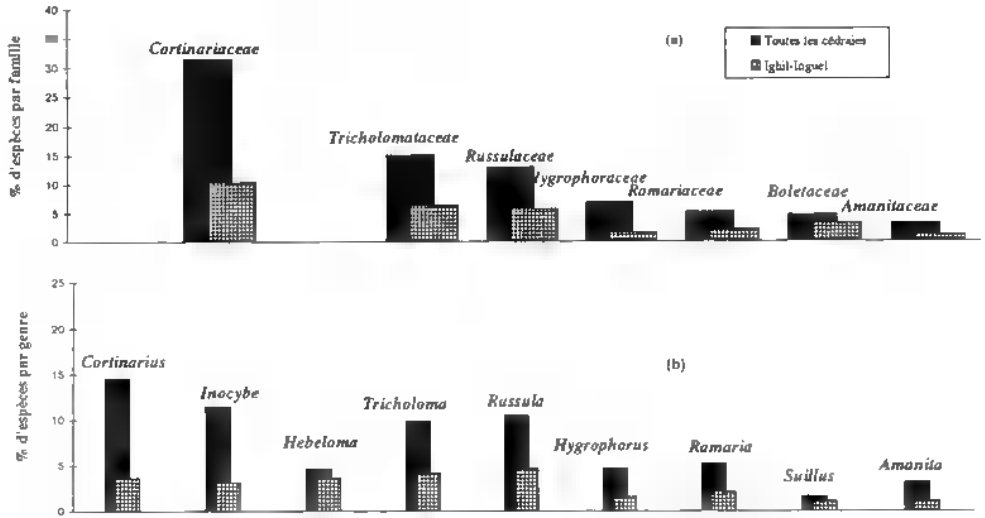


Figure 1 : Répartition des espèces mycorrhiziennes dans toutes les cédraies inventoriées et dans celle d'Ighil-Inguel par familles (a) et par genres (b).

Figure 1 : Distribution of mycorrhizal species according to families (a) and to genera (b) in cedar forest of Ighil-Inguel and elsewhere in North Africa and in France.

Hygrophorus russula var. *cedretorum* et *Hebeloma eburneum*, absents dans toutes les cédraies inventoriées par les autres auteurs, se développent à Ighil-Inguel.

3. Evolution du cortège fongique

La limitation de la zone d'étude à un hectare et le nombre restreint de prospections ne nous ont pas permis d'avoir une idée complète de l'évolution du cortège mycorrhizien en fonction de l'âge du peuplement. L'observation de 36 espèces mycorrhiziennes récoltées, en décembre 1991, au niveau de la « crête des millénaires » (tableau 2) nous a cependant fourni un exemple de distribution de champignons (figure 2). La plupart des espèces n'étaient présentes qu'à un seul exemplaire sur la parcelle d'étude. Seul *Cortinarius* stirpe *duracinus* formait des peuplements abondants. Les inocybes étaient également fréquents, mais sans former de peuplements abondants.

Tout au long de nos relevés, nous avons constaté que la diversité des espèces fongiques sous les jeunes peuplements était moindre que celle observée sous les arbres âgés. Il est difficile de donner un âge précis aux arbres à proximité desquels les champignons ont fructifié. Par ailleurs, la forte densité du peuplement végétal au niveau du site d'étude et le mélange des jeunes peuplements aux arbres âgés ne permettent généralement pas d'établir une relation entre tel carpophore et tel ou tel arbre. En conséquence, nous avons surtout considéré les espèces fongiques présentes dans les jeunes peuplements. Ces espèces sont peu nombreuses ; nous en avons récolté 9 (7 sont présentées dans le tableau 2) ; elles appartiennent aux genres *Hebeloma*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Sclerotium* et *Tricholoma* ; deux autres espèces ont été identifiées par la morphologie des

1. <i>Hebeloma sordidum</i>	19. <i>Inocybe subbrunnea</i>
2. <i>Inocybe kuehneri</i>	20. <i>Cortinarius duracinus</i>
3. <i>Hygrophorus chrysodon</i>	21. <i>Inocybe rimosa</i>
4. <i>Tricholoma tridentinum</i> var. <i>cedretorum</i>	22. <i>Ramaria botrytis</i>
5. <i>Cortinarius cedretorum</i>	23. <i>Inocybe</i> spp.
6. <i>Russula delica</i>	24. <i>Inocybe</i> spp.
7. <u><i>Hebeloma crustuliniforme</i></u>	25. <i>Inocybe nitidiuscula</i>
8. <u><i>Scleroderma verrucosum</i></u>	26. <i>Ramaria flavicolor</i>
9. <u><i>Hebeloma</i> spp.</u>	27. <i>Lyophyllum fumosum</i>
10. <i>Inocybe</i> spp.	28. <i>Cortinarius herculeus</i>
11. <i>Lyophyllum decastes</i>	29. <i>Cortinarius calochrous</i>
12. <i>Russula nigricans</i>	30. <i>Tricholoma caligatum</i>
13. <i>Tricholoma josserandii</i>	31. <i>Xerocomus chrysenteron</i>
14. <i>Inocybe</i> spp.	32. <i>Cortinarius elegantissimus</i>
15. <i>Cortinarius castaneus</i>	33. <i>Russula subfoetens</i>
16. <i>Tricholoma portentosum</i>	34. <u><i>Hygrophorus eburneus</i></u>
17. <i>Tricholoma saponaceum</i>	35. <u><i>Hygrophorus russula</i> var. <i>cedretorum</i></u>
18. <i>Hebeloma versipelle</i>	36. <u><i>Hebeloma eburneum</i></u>

Tableau 2 : Espèces récoltées à la cédraie d'Ighil-Inguel, en décembre 1991 et mentionnées à la figure 2.

Souligné : espèces trouvées dans les jeunes peuplements

Table 2 : Fungal species collected in the Ighil-Inguel cedar forest, December 1991 (see figure 2).

Underlined : species collected under young stands of *Cedrus atlantica*.

mycorhizes présentes (*Cenococcum graniforme* et *Tuber* stirpe *borchii*). Les espèces présentes sous les arbres âgés offrent en effet moins d'intérêt en tant qu'espèces potentiellement utilisables pour la mycorhization contrôlée, car il n'est pas sûr qu'elles soient capables de mycorhizer des plants jeunes.

DISCUSSION

1. Richesse en espèces mycorhiziennes

Nous avons répertorié, dans la cédraie d'Ighil-Inguel, beaucoup plus d'espèces mycorhiziennes que ne l'ont fait les autres auteurs au niveau d'une seule cédraie : au total

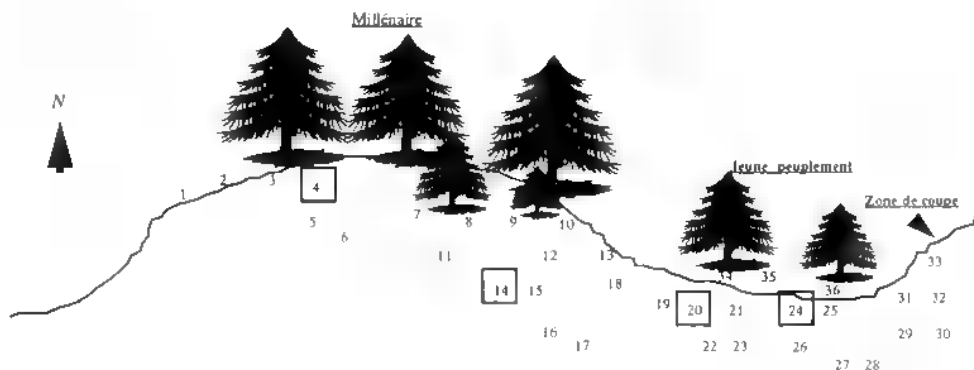


Figure 2 : Distribution de quelques espèces de champignons mycorrhiziens sur la « crête des millénaires » (Tala-Guilef, décembre 1991) (□ espèces trouvées en plusieurs endroits).

Figure 2 : Occurrence of some mycorrhizal species along the « crest of the thousand years » (Tala-Guilef, December 1991) (□ species found in several places).

71 espèces, appartenant à 29 genres. Certaines listes de champignons supposés mycorrhiziens établies par divers auteurs peuvent paraître moins complètes que d'autres, ou même contradictoires, si l'on ne tient pas compte des remaniements effectués plus tard dans la classification des champignons supérieurs. Ainsi le genre *Xerocomus* ne figure-t-il pas dans la liste de Miller (1982a) et le genre *Tuber* est-il absent de celle de Harley & Smith (1983) ; le genre *Chalciporus* est absent de toutes les listes. Selon Harley (1969), la majorité des espèces mycorrhiziennes sont des Basidiomycètes de la famille des *Agaricaceae* (au sens large et non au sens actuel) et de celle des *Boletaceae*. En fait, de nombreux Ascomycètes sont également mycorrhiziens.

Sur les 71 espèces mycorrhiziennes de la cédraie d'Ighil-Inguel, 40 espèces sont signalées pour la première fois en Algérie (sur un total de 117 espèces mycorrhiziennes relevées dans l'ensemble des cédraies algériennes). Parmi les 193 espèces mycorrhiziennes (30 familles, 47 genres) différentes relevées en Algérie, au Maroc et en France, dans les différentes études réalisées jusqu'ici, 23 espèces (14 genres) trouvées au cours de notre étude sont signalées pour la première fois sous *C. atlantica*.

Dans notre étude bibliographique, nous avons relevé pour l'ensemble des cédraies d'Algérie un total de 117 espèces mycorrhiziennes appartenant à 24 familles et 37 genres, contre 105 espèces (20 familles, 30 genres) dans les cédraies du Maroc. Au Maroc, Abourouh (1990, 1995) relève, d'après Malençon & Bertault (1970b, 1975) et d'autres auteurs, 75 espèces appartenant à 14 genres susceptibles de former des mycorrhizes avec le cèdre. Il observe aussi deux types de mycorrhizes, attribuées à *Cenococcum graniforme* et probablement à *Tricholoma caligatum* (Abourouh, 1990, 1995). Dans les cédraies du Midi de la France, qui ne sont pas pures, Rioussat & Rioussat (1991) ont répertorié plus de 350 espèces, dont ils considèrent 63 comme caractéristiques. Selon nous, 60 sont mycorrhiziennes dont 18 familles et 30 genres.

Lorsque l'on compare les différents relevés, on constate qu'environ la moitié des espèces ne se trouvent que dans une seule des sept aires géographiques mentionnées au tableau 1. Ce chiffre relativement faible peut s'expliquer par le fait que la plupart des relevés n'ont été effectués que pendant une seule année (Mousain, *in* Toth, 1988), ou bien

ont été effectués pendant plusieurs années mais sur une surface limitée (Nezzar-Hocine, 1996b).

Les espèces qui sont présentes à la fois dans les cédraies du Maghreb et de la France sont des espèces spécifiques ; *Geopora sumneriana* se retrouve dans toutes les stations, sauf au Mont-Ventoux, et *Cortinarius herculeus* ne figure pas dans les listes de Maire, car il n'a été décrit que plus tard. D'autres espèces, non spécifiques cette fois, sont présentes dans toutes les stations de France et dans celles du Maghreb, comme *Tricholoma terreum*. *Boletopsis leucomelaena* est absent uniquement dans les inventaires de Maire. Certaines espèces sont présentes dans au moins une cédraie en Algérie, au Maroc et en France : *Inocybe geophylla*, *I. fastibile* (dans toutes les cédraies du Maghreb), *Lyophyllum decastes*, *L. deliberatum*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. sinapizans* (dans toutes les cédraies de France). Les espèces nouvellement décrites (Berthet & Rioussel, 1963 ; Capellano & Rioussel, 1968 ; Forte & Neville, 1994) se trouvent rarement citées par d'autres auteurs que ceux qui les ont décrites. *Gomphus crassipes* (Dufour) Maire qui a été trouvé pour la première fois en 1888, dans la forêt de Teniet-El-Had, par Dufour (1889) qui l'a nommé *Cantharellus crassipes*, puis par Maire (1914) et par Malençon (1957), n'a été signalé depuis qu'en 1994, dans une cédraie du sud de la France (Forte & Neville). Deux autres exemples sont ceux d'*Hypotarzetta insignis* (= *Pustularia i.*) décrit par Berthet & Rioussel (1963), signalé plus tard au Maroc par Malençon & Bertault (1970a) et de *Geastrum melanocephalum*, décrit par Capellano & Rioussel (1968) ; depuis, ces espèces n'ont été mentionnées dans aucune autre cédraie.

Le nombre important de champignons mycorrhiziens que nous avons obtenu peut s'expliquer par le fait que nous avons effectué davantage de relevés que les autres auteurs et que nous avons eu à notre disposition des listes de champignons plus complètes et plus récentes, beaucoup d'espèces rencontrées à l'époque de Maire n'étant pas encore décrites. Enfin, notre recherche était orientée surtout sur les champignons mycorrhiziens.

Le nombre d'espèces mycorrhiziennes relevées dans les différentes cédraies étudiées reste évidemment inférieur au nombre réel, en particulier parce que les champignons hypogés n'ont pas été pris en considération, à l'exception de quelques *Melanogaster* et *Tuber* (Rioussel & Rioussel, 1991). La plupart des espèces identifiées dans notre étude appartiennent à des familles bien connues pour leur caractère mycorrhizien : *Cortinariaceae*, *Russulaceae*, *Tricholomataceae* (cette dernière famille comprenant également des espèces saprophytes). Nous n'avons observé que peu d'espèces des familles des *Amanitaceae* (espèces surtout printanières), des *Boletaceae* et des *Hygrophoraceae* (famille réputée plutôt septentrionale), connues pour être également ectomycorrhiziennes.

Si beaucoup de bolets et lactaires sont associés au mélèze, le cortège mycorrhizien du cèdre de l'Atlas semble être caractérisé par la présence des cortinaires, inocybes, russules et tricholomes (figure 1b). Ces genres sont les plus riches en espèces ; ils comptent à eux seuls 46 % de l'ensemble des espèces relevées dans toutes les cédraies (42 % à Ighil-Inguel). Ces mêmes genres représentent 50 % des espèces relevées dans les cédraies du Maroc et 30 % de celles relevées dans les cédraies du Midi de la France. Il faut ajouter les hébélomes, les hygrophores et les ramaires qui sont assez bien représentés (15 % de l'ensemble des espèces)

Le cortège de champignons mycorrhiziens de la cédraie d'Ighil-Inguel n'est pas moins diversifié que celui de forêts à base d'autres résineux ou de feuillus. Comme le rappellent Singer & Modess (1965, in Singer, 1969), le pourcentage de champignons mycorrhiziens, par rapport à celui de l'ensemble de la macroflore fongique, dépend des conditions édaphiques et climatiques, mais aussi du nombre d'espèces d'arbres-hôtes dans une communauté. Le nombre d'espèces fongiques mycorrhiziennes est constant pour une

Situation géographique		Auteurs	Nombre d'espèces		Nombre d'espèces mycorhiziennes différentes, toutes études confondues		
			total	mycorhiziennes			
ALGERIE	Djurdjura		Nezzar-Hocine <i>et al.</i>	100	71	73	117
			Maire		2		
	Atlas tellien	Chrèa	Maire	91	60	64	
			Lanier	37			
			M.A.R.A.	17			
			Mal. & Bert	3			
		Teniet -El Had	Maire	36	18		
	Autres régions		Mal. & Bert		25	26	
Maire				3			
MAROC	Moyen Atlas, Rif, Autres régions		Maire & Wer.		31	105	105
			Mal. & Bert	190	73		
			Bertault		13		
			Autres*		9		
FRANCE	Petit-Lubéron		Riousset. & Riousset.	63	31	39	60
			Mousain	25	8		
	Mont-Ventoux		Mousain	39	19	20	
			Bidaud		1		
	Autres régions		Lanier	30	17	19	
			Autres ■	5	5		
TOTAL			+ 700	383		193	

Tableau 3 : Nombre d'espèces inventoriées dans les différentes cédraines du Maghreb et de la France. Souligné : espèces trouvées dans les jeunes peuplements

Table 3 : Number of species reported from different Atlas cedar forests localized in Algeria, Morocco and France.

Underlined : species collected under young stands of *Cedrus atlantica*.

association donnée. Pour le cèdre de l'Atlas, Bouteville estime ce nombre à une centaine environ.

Comme le fait remarquer Durrieu (1993), la grande diversité de la flore ectomycorhizienne s'exprime, bien sûr, au niveau d'un peuplement, mais aussi au niveau d'un seul individu. Il cite Becker (1956) qui a observé neuf espèces de champignons fructifiant simultanément autour d'un pin sylvestre et Ford *et al.* (1980) qui signalent au pied d'un même bouleau, des champignons de quatre espèces différentes. Chez le cèdre de l'Atlas et dans le site d'étude d'Ighil-Inguel, la diversité est moins grande ; 1 à 3 espèces au maximum ont été observées sous un même arbre (Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b). De plus les fructifications n'étaient pas abondantes. Il faut rappeler que trois des quatre années (1989/1992) durant lesquelles les prospections ont été effectuées à Ighil-Inguel ont été considérées par Abdesselam (1995) comme des années présentant un déficit hydrique, seule l'année 1990/91 pouvant être considérée comme moyenne. Ces conditions climatiques n'ont sans doute pas permis le développement optimal des mycéliums dans le sol ni la formation massive de sporophores (Nezzar-Hocine *et al.*, publication en cours).

La richesse des cédraies de France et du Maghreb en espèces mycorhiziennes (193) s'accompagne aussi d'une grande diversité dans les genres (47) et les familles (30).

Parmi les espèces rencontrées en cédraie, certaines sont signalées par Malençon & Bertault (1970b, 1975) comme fréquentes (*Inocybe geophylla*, *Hygrophorus purpurascens*, *Lyophyllum carbonarium*, *Tricholoma equestre*) ; d'autres sont communes dans toutes les cédraies à l'automne (*Cortinarius candellaris*, *Lyophyllum aggregatum* var. *typicum*, *Tricholoma cedrorum*) ou au printemps (*Cortinarius aurasiacus*, *Hygrophorus chrysodon*, *H. purpurascens*, *Inocybe brunnea*, *Lyophyllum aggregatum*, *Russula densifolia*, *R. turci*, *R. sublaevispora*). *Tricholoma pessundatum* est considéré comme l'une des l'espèce les plus communes et peut-être les plus précoces et les plus abondantes dans le Moyen Atlas. *C. duracinus*, commun dans les cédraies du Moyen Atlas et du Rif, est la seule espèce à avoir fructifié en abondance à Ighil-Inguel. Certaines espèces sont peu fréquentes : *Hygrophorus carneogriseus*, *Gomphus crassipes*, *Lyophyllum onychinum* ; d'autres sont plutôt rares (*Inocybe queletii*, *I. orbata*). Malençon & Bertault (1970b) expliquent que l'apparition irrégulière de certaines espèces ou leur rareté sont très liées aux conditions climatiques : des espèces comme *Cortinarius prasimus* et *Russula anthracina* var. *carneifolia* (Bertault, 1978a) n'ont été observées qu'une seule fois en trente cinq ans !

Un grand nombre d'espèces associées à *Quercus ilex* au Maroc (Maire & Werner, 1937 ; Malençon & Bertault, 1970b, 1975), ou à *Quercus spp.* (Trappe, 1962) sont également associées au cèdre de l'Atlas. La présence d'espèces fongiques communes aux deux essences peut s'expliquer par le fait que, dans leur aire naturelle, différents *Quercus* (en particulier *Q. ilex*) occupent le même étage géographique que le cèdre de l'Atlas ; c'est le cas de la forêt du Djurdjura (Tala-Guilef). Les espèces mycorhiziennes de la cédraie d'Ighil-Inguel communes à celles de la chênaie (chênes zeen et liège) de Beni-Ghorbi (Yakouren) sont au nombre de 6 : *Amanita rubescens*, *Cortinarius calochrous*, *Ramaria aurea*, *Scleroderma verrucosum*, *Tricholoma saponaceum* et *T. terreum* (Zemmouri, 1984).

Parmi la flore fongique du cèdre, un grand nombre d'espèces saprophytes ou mycorhiziennes sont de bons comestibles. En plus de celles rencontrées à la cédraie d'Ighil-Inguel, nous pouvons citer : *Amanita gemmata*, *A. ovoidea*, *Cortinarius multififormis*, *C. variegatus*, *Clavariadelphus truncatus*, *Morchella conica*, *Tricholoma equestre*, « comestible de première qualité » (Marchand, 1971), « estimé et recherché » (Malençon & Bertault, 1975), *T. squarulosum*, un des meilleurs comestibles de son groupe, *T. orirubens*, *T. portentosum*, *Russula grisea*, *R. integra*, *Suillus luteus*, etc...

2. Espèces mycorhiziennes spécifiques

Certaines espèces (14) sont fidèlement associées au cèdre. Elles appartiennent aux genres *Cortinarius* (*C. aurasiacus*, *C. cedretorum*, *C. herculeus*), *Galerina* (*G. cedretorum*), *Gautiera* (*G. trabutii*), *Geopora* (*G. sumneriana*), *Hebeloma* (*H. eburneum*), *Hygrophorus* (*H. russula* var. *cedretorum*, *H. purpurascens* var. *cedretorum*), *Inocybe* (*I. aurantifolia*, *I. scabeliformis*), *Ramaria cedretorum*, *Tricholoma* (*T. cedrorum*, *T. tridentinum* var. *cedretorum*). Parmi ces espèces, 8 se retrouvent à Ighil-Inguel. Pour l'instant nous n'avons répertorié aucune espèce de russule spécifique du cèdre, bien que le genre *Russula* soit bien représenté dans les cédraies du Maghreb.

Tout comme d'autres auteurs, nous n'avons pas rencontré certaines espèces spécifiques décrites par Maire (1914, 1928), telles *Galerina cedretorum* et *Hygrophorus purpurascens* var. *cedretorum*. Des espèces comme *Cortinarius aurasiacus* Pat., *Tricholoma cedrorum* Maire, *Gautiera trabutii* (Chatin) Pat. et *Clavaria cedretorum* n'ont été citées que par Maire et Malençon (*C. cedretorum* l'a également été par Le Poutre). Ces espèces spécifiques, rares, peu décrites dans les ouvrages de mycologie, sont donc difficiles à identifier. D'autres espèces récemment décrites sont encore peu connues. Parmi les espèces non identifiées récoltées dans la cédraie d'Ighil-Inguel, certaines pourraient être des espèces intéressantes et/ou spécifiques.

La faible quantité d'espèces symbiotes spécifiques du cèdre (quinze seulement) semble être une caractéristique générale de la symbiose ectomycorhizienne. Pour d'autres essences, le nombre d'espèces spécifiques est encore moins important. Le Tacon *et al.* (1984) relèvent 7 espèces pour *Quercus robur*, 7 pour *Fagus sylvatica* et 8 pour *Betula verrucosa*.

La majorité des symbiotes ectomycorhiziens du cèdre acceptent un large spectre d'hôtes. Certaines espèces trouvées en association avec le cèdre de l'Atlas en Algérie semblent être communes à un grand nombre de conifères et de feuillus ; c'est le cas de *Boletus erythropus* Pers., *Xerocomus chrysenteron* (Bull.) QuéL., *L. laccata* (Scop. : Fr.) Cooke et *H. crustuliniforme* (Bull.) QuéL. La plupart des champignons mycorhiziens récoltés dans la cédraie d'Ighil-Inguel sont des espèces communément associées à de nombreuses essences forestières feuillues et/ou résineuses (Nezzar-Hocine *et al.*, 1996b).

3. Evolution du cortège mycorhizien

Comme de nombreux auteurs l'ont signalé à propos d'autres essences forestières, le cortège fongique du cèdre de l'Atlas se diversifie progressivement au cours du temps. Les anglo-saxons Mason *et al.* (1982 et 1983) ont différencié les champignons mycorhiziens en « early-stage species » (espèces capables de produire des sporophores sur des arbres jeunes) et « late-stage species » (espèces ne produisant des sporophores que sur des arbres adultes). Ainsi, le genre *Tricholoma* est en général considéré comme produisant des champignons de stade tardif (Deacon *et al.*, 1983 ; Mason *et al.*, 1983 ; Fleming *et al.*, 1986 ; Chu-Chou & Grace, 1988). *T. pessundatum*, sous *P. pinaster*, est plutôt considéré comme champignon de stade intermédiaire que comme champignon de stade adulte (Guinberteau *et al.*, 1987). Pourtant, dans la cédraie d'Ighil-Inguel, certains tricholomes s'associent aussi bien avec des jeunes cèdres qu'avec les cèdres âgés. L'association mycorhizienne a même pu être obtenue en conditions gnotoxéniques avec un isolat de *Tricholoma tridentinum* var. *cedretorum* (Nezzar-Hocine *et al.*, 1998).

Nos observations concordent avec celles de nombreux auteurs qui soulignent que le nombre d'espèces fongiques susceptibles de s'associer avec de jeunes plants est faible, en général de 2 à 6 (Fassi & Fontana, 1966 ; Mason *et al.*, 1982 ; Fox, 1983 ; Le Tacon *et al.*, 1984 ; Garbaye *et al.*, 1986 ; Chu-Chou & Grace, 1988). Généralement, la biodiversité fongique augmente avec l'âge du peuplement (Thoen, 1980 ; Le Tacon *et al.*, 1984 ; Al-Abras, 1985 ; Guinberteau, 1987).

A partir d'observations sur le terrain et d'essais de mycorhization réalisés avec le cèdre de l'Atlas (Hocine *et al.*, 1991 ; Hocine *et al.*, 1994 ; Hocine, in Mousain 1996 ; Nezzar-Hocine *et al.*, 1996a et b), on peut dresser une liste de champignons susceptibles d'être utilisés dans des programmes de mycorhization contrôlée. Il s'agit d'espèces appartenant aux genres, *Cenococcum*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Hygrophorus*, *Scleroderma*, *Thelephora*, *Tricholoma* et *Tuber*.

Cette succession dans le temps du cortège fongique s'accompagne également d'une répartition non aléatoire des espèces (Becker, 1956 ; Ford *et al.*, 1980), en relation avec un déplacement et une progression centrifuge, le long des racines, des sites de fructification de chaque espèce en fonction du temps (Guinberteau, 1987). Pour notre part, nous n'avons pas pu suivre cette évolution, compte tenu du faible nombre d'années d'observations (4). Notre étude doit donc être poursuivie, car une meilleure connaissance de la structure spatiale des mycéliums des champignons mycorrhizogènes doit permettre de mieux comprendre leur écologie et le type de relations qu'ils entretiennent avec les autres organismes de l'écosystème (Durrieu, 1993).

CONCLUSION

La flore fongique mycorhizienne du cèdre de l'Atlas est très riche en espèces, puisqu'elle compte 193 espèces différentes, sur plus de 700 espèces répertoriées dans les différentes cédraies d'Algérie, du Maroc et de France.

Le cortège mycorhizien de la cédraie d'Ighil-Inguel est également très important. Nous avons répertorié beaucoup plus d'espèces mycorhiziennes que ne l'on fait les autres auteurs, puisque 71 espèces appartenant à 29 genres ont pu être relevées sur un site très limité. Sur un total de 117 espèces mycorhiziennes répertoriées dans les cédraies d'Algérie, 40 d'entre elles sont signalées pour la première fois dans ce pays ; 23 espèces n'avaient encore jamais été observées sous *Cedrus atlantica*. La diversité du cortège mycorhizien du cèdre se retrouve également dans les cédraies du Maroc, mais apparaît plus limitée dans celles du Midi de la France.

La majorité des espèces de la cédraie d'Ighil-Inguel sont des Homobasidiomycètes, avec 13 ordres et 20 familles. Les familles qui renferment le plus grand nombre d'espèces, que ce soit à Ighil-Inguel ou dans les autres cédraies du Maghreb et de la France, sont, par ordre décroissant, les *Cortinariaceae*, les *Tricholomataceae* et les *Russulaceae*. Les *Hygrophoraceae*, les *Boletaceae* et les *Ramariaceae* sont également bien représentés. Parmi les champignons mycorhiziens relevés, il existe toute une gamme d'excellents comestibles.

La cédraie d'Ighil-Inguel compte 8 espèces mycorhiziennes spécifiques du cèdre, sur les 14 espèces signalées dans l'ensemble des cédraies étudiées.

La diversité des espèces fongiques sous les jeunes régénérations est moindre que celle observée sous les arbres âgés. Les espèces des jeunes régénérations appartiennent aux genres *Cenococcum*, *Hebeloma*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Scleroderma*, *Tricholoma*

et *Tuber*.

Malgré les difficultés liées à l'instabilité de la taxonomie et de la nomenclature des champignons supérieurs, cette étude nous a permis, d'une part de réactualiser les listes anciennes de Maire et de Werner à diffusion très limitée et de rassembler les différentes espèces citées par Malençon et Bertault en un seul document, d'autre part d'établir une liste de symbiotes du cèdre, parmi lesquels pourront être choisis les futurs candidats à des essais de mycorrhization contrôlée.

REMERCIEMENTS : Nous remercions le Dr. R. Courtecuisse, de la Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques de l'Université de Lille 2, le Professeur G. Durrieu, du Laboratoire Botanique et Forestier de l'Université Paul Sabatier, le Dr. J.J. Guillaumin, de l'Unité de Pathologie végétale et de Mycologie de l'INRA de Clermont-Ferrand, d'avoir bien voulu accepter de lire notre manuscrit et de l'enrichir par leurs remarques et leurs suggestions.

RÉFÉRENCES

- ABDESSELAM M., 1995 — *Structure et fonctionnement d'un karst de montagne sous climat méditerranéen : exemple du Djurdjura occidental (Grande Kabylie-Algérie)*. Doctorat d'Université en Sciences de la Terre, Université de Franche-Comté, 232 p.
- ABOUROUH M., 1990 — La particularité de la symbiose ectomycorhizienne chez *Cedrus atlantica* Manetti. *Symposium International du cèdre*, 22-27 octobre 1990, Antalya, Turquie, pp. 136-142.
- ABOUROUH M., 1995 — Natural ectomycorrhizae of *C. atlantica* in Morocco. *Cryptogamic Botany* 4 (5) : 332-340.
- AL-ABRAS K., 1985 — *Evolution des types de mycorrhizes de l'épicéa commun en fonction de l'âge*. D.E.A., Université de Nancy I, 55 p.
- BECKER G., 1956 — *Observations sur l'écologie des champignons supérieurs*. Thèse Faculté des Sciences de Besançon : 128 p.
- BERTAULT R., 1964 — Amanites du Maroc. 1^{ère} contribution. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 80 (3) : 21 p.
- BERTAULT R., 1965 — Amanites du Maroc. 2^e contribution. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 81 (3) : 27 p.
- BERTAULT R., 1978a — Russules du Maroc. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 4 (1) : 27 p.
- BERTAULT R., 1978b — Lactaires du Maroc. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 94 (3) : 16 p.
- BERTEA P., BON M., CHEVASSUT G., COURTECUISSIE R., LECOT C., NEVILLE P., PROUST F. & RASCOL J.P., 1989 — *Noms corrects et synonymes correspondants des champignons présents habituellement dans les expositions et les ouvrages classiques*. 2^{ème} édition, septembre 1989, Fédération des Associations Mycologiques Méditerranéennes (F. A. M. M.), 127 p.
- BERTHET P. & RIOUSSET L., 1963 — Un *Pustularia* nouveau : *P. insignis*. Description de l'espèce et remarque sur un caractère cytologique du genre *Pustularia*. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 79 (3) : 392-398.
- BIDAUD A., 1990 — Les Hébélomes. *Bulletin de la Fédération Dauphiné et Savoie* 117 : 28-3.
- BON M., 1984 — *Les tricholomes de France et d'Europe occidentale*. Paris, Lechevalier, 324 p.
- BON M., 1991 — Flore mycologique d'Europe n° 2, tricholomes et ressemblants. *Documents mycologiques hors série*, 163 p.

- CAPELLANO A. & RIOUSSET L., 1968 — *Geastrum melanocephalum* (Czern.) Stanek f. *melanocephalum* (= *Trichaster melanocephalus* Czern.) en France. *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon* 37 (8) : 331-335.
- CHU-CHOU M. & GRACE L.J., 1988 — Mycorrhizal fungi of radiata pine in different forests of the north and south in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 20 (6) : 883 — 886.
- COULON M. & RIOUSSET L., 1967 — Contribution à l'étude de la flore mycologique de la cédraie du Petit Lubéron. *Bulletin de la Société d'Etude des Sciences Naturelles du Vaucluse* 15 : 7-19.
- COURTECUISSÉ R., 1994 — *Guide des champignons de France et d'Europe*. Lausanne — Paris, Delachaux & Niestlé, 476 p.
- DEACON J.W., DONALDSON S. J. & LAST F.T., 1983 — Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant and Soil* 71 : 257-262.
- DUFOUR L., 1889 — Une espèce nouvelle de chanterelle. *Revue Générale de Botanique* 1 : 357-358.
- DURRIEU G., 1993 — *Ecologie des champignons*. Paris, Masson, 207 p.
- FASSI B. & FONTANA A., 1966. Researches on ectotrophic mycorrhizae of *Pinus strobus* in nurseries. II. Mycorrhizae of *Thelephora terrestris* Ehrh. ex Fries, *Laccaria laccata* (Scop.) Berk. & Br. and *Hebeloma mesophaeum* Pers. ex Fries. *Allionia* 12 : 47-53.
- FLEMING L.V., DEACON J.W. & LAST F.T., 1986 — Ectomycorrhizal succession in a scottish birch wood. In : Gianinazzi-Pearson V & Gianinazzi S. (eds), *Mycorrhizae : physiology and genetics*. Proceedings 1st ESM, Dijon, INRA Paris, pp. 259-263.
- FORD E.D., MASON P.A. & PELHAM J., 1980 — Spatial patterns of sporophore distribution around a young birch tree in three successive years. *Transactions of the British Mycological Society* 75 : 287-296.
- FORTE J. & NEVILLE P., 1994 — Une *Aphyllphoromycetidae* nouvelle pour l'Europe : *Gomphus crassipes* (Dufour) R. Maire (*Gomphaceae* Donk). *Bulletin Fédéral de l'Association Mycologique Méditerranéenne*, n. s. 6 : 17 — 20.
- FOX F.M., 1983 — Role of basidiospores as inocula of mycorrhizal fungi of birch. *Plant and Soil* 71 : 269-273.
- GARBAYE J., MENEZ J. & WILHELM M.E., 1986 — Les mycorhizes des jeunes chênes dans les pépinières et les régénérations naturelles du nord-est de la France. *Acta Oecologica, Oecologia Plantarum* 7 (21) : 87-96.
- GUINBERTEAU J., 1987 — Evolution du cortège fongique associé au pin maritime dans les conditions d'un peuplement expérimental. *Compte Rendu 1^{er} Symposium sur le cèpe*. Labastide d'Armagnac, pp. 25-29.
- HARLEY J. L., 1969 — *The biology of mycorrhiza*. London, Leonard Hill Ltd., 334 p.
- HARLEY J.L. & SMITH S.E., 1983 — *Mycorrhizal symbiosis*. New York & London, Academic Press, 483 p.
- HOCINE H., PERRIN R. & BELARBI R., 1990 — Variation of mycorrhizal association of *Cedrus atlantica* Manetti : the example of Tala-Guilef forest (Djurdjura). 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Agadir, Morocco, October 28th — November 3rd 1990, p. 441.
- HOCINE H., CHEVALIER G., PERRIN R. & BELARBI R., 1991 — Les mycorhizes de *Cedrus atlantica* en forêt et en pépinière. *Compte rendu du Groupe de travail « Application des mycorhizes »*, 10-12 octobre 1991, I.N.R.A., Bordeaux.
- HOCINE H., BELARBI R., PERRIN R. & CHEVALIER G., 1994 — Possibilités de mycorhization de *Cedrus atlantica* Manetti. *Annales de la Recherche Forestière du Maroc* 27 (1) : 350-361.
- KÜHNER R. & ROMAGNESI H., 1974 — *Flore analytique des champignons supérieurs (Agarics, Bolets, Chanterelles)*. Paris, Masson, 556 p.
- LANIER L., 1994 — Les champignons des cédraies en Algérie (étude comparative). *Annales de la Recherche Forestière au Maroc* 27 (2) : 553-563.
- LE POUTRE B., 1961 — Recherches sur les conditions édaphiques de la régénération des cédraies marocaines. Rapport 1957-1961. *Annales de la Recherche Forestière du Maroc* 6 (2) : 1-21.

- LE TACON F., LAMOURE D., GUINBERTEAU J. & FIKET C., 1984 — Les symbiotes mycorrhiziens de l'épicéa commun et du douglas dans le Limousin. *Revue Forestière Française* 36 : 325-338.
- MAIRE R., 1914 - La flore mycologique des forêts de cèdres de l'Atlas. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 30 : 199-220.
- MAIRE R., 1927 — Compte-rendu de la session extraordinaire de la Société mycologique de France, à Alger (novembre 1926). *Bulletin de la Société Mycologique de France* 43 (3-4) : 2-19.
- MAIRE R., 1928 — Diagnoses de champignons inédits de l'Afrique du Nord. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 44 : 37-56.
- MAIRE R. & WERNER R. G., 1937 - Fungi Marocani. Catalogue raisonné des champignons connus jusqu'ici au Maroc. *Mémoires de la Société des Sciences Naturelles du Maroc*, Rabat, Liouville J., 45, 147 p.
- MALENÇON G., 1957 — Prodrome d'une flore mycologique du moyen Atlas, 4^{ème} contribution. *Bulletin de la Société Mycologique de France* 73 (4) : 289-330.
- MALENÇON G., 1974-1975 -- Champignons hypogés du nord de l'Afrique. II Basidiomycètes. *Revue mycologique* 39 : 279-306.
- MALENÇON G. & BERTAULT R., 1970a — Champignons du Maroc II. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles et Physiques du Maroc* 49 : 69-80.
- MALENÇON G. & BERTAULT R., 1970b — Flore des champignons supérieurs du Maroc. Tome 1. Faculté des sciences de Rabat, Maroc, 601 p.
- MALENÇON G. & BERTAULT R., 1975 — Flore des champignons supérieurs du Maroc. Tome 2. Faculté des sciences de Rabat, Maroc, 539 p.
- M.A.R.A., 1992 — A la découverte des champignons du parc. Note du Ministère de l'Agriculture d'Algérie sur le Parc National de Chréa. 11 p.
- MARCHAND A., 1971 — *Champignons du Nord et du Midi. Les meilleurs comestibles et tous les vénéneux*. Perpignan, France, Hachette (3^e édition), tome 1, 281p.
- MASON P.A., LAST F.T., PELHAM J. & INGLEBY K., 1982 Ecology of some fungi associated with and ageing stand of birches (*Betula pendula* and *Betula pubescens*). *Forest Ecology and Management* 4 : 19-39.
- MASON P.A., WILSON J., LAST F.T. & WALKER C., 1983 — The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil* 71 : 247-256.
- MEYER F.H., 1973 — Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forests. In : Marks G.C. & Kozlowski T.T. (eds.), *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. New York & London, Academic Press, pp. 79-105.
- MILLER O.K., 1982a — Taxonomy of ecto — and ectendomycorrhizal fungi. In : Schenk N.C. (ed.), *Methods and principles of mycorrhizal research*. Saint Paul, Minnesota, American Phytopathology Society, pp. 91-101.
- MILLER O.K., 1982b — Ectomycorrhizae in the *Agaricales* and *Gasteromycetes*. *Canadian Journal of Botany* 60 : 909-916.
- MOLINA R. & TRAPPE J.M., 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Science* 28 : 423-458.
- MOSSE B., STRIBLEY D.P & LE TACON F., 1981 — Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. In : Alexander M. (ed.), *Advances in microbial ecology*. New-York, Cornell Union, Plenum publishing corporation 4, pp. 137-210.
- MOUSAIN D., 1996 — Création des peuplements. In : Bariteau M., Etienne M., Mousain D. & Thibaut B. (eds.), *Création et gestion des peuplements forestiers méditerranéens* (Première réunion GRAM, 21-23 mars 1996, Avignon), Avignon, INRA Eds, pp. 113-116.
- NEZZAR-HOCINE H., PERRIN R. & HALLI-HARGAS R., 1995 — Mesure du potentiel infectieux ectomycorhizien du sol de la cédraie de d'Ighil-Inguel (Djurdjura) : application à l'inoculation d' un substrat de pépinière. In : Abourouh M.(ed.). Les actes du 2^{ème} Colloque National Plants Forestiers. Centre National de la Recherche Forestière du Maroc (sous presse).

- NEZZAR-HOCINE H., HALLI-HARGAS R., CHEVALIER G., PERRIN R., 1996a — Mycorrhization of *Cedrus atlantica* with *Laccaria laccata* under controlled conditions. In : Azcon-Aguilar C. & Barea J.M. (ed.), *Mycorrhizas in integrated systems from genes to plant development* (Proceedings of the fourth European Symposium on Mycorrhizas, Granada, Spain, 11-14 July 1994), Brussels, European Commission (DG XII, SRD), pp. 565-568.
- NEZZAR-HOCINE H., BOUTEVILLE R. J., HALLI-HARGAS R. & CHEVALIER G., 1996b — La macroflore fongique de *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex. Carrière. I — Inventaire des espèces d'une cédraie du massif du Djurdjura (Algérie) et connaissances actuelles sur les champignons des cédraies. *Cryptogamie-Mycologie* 17 (2) : 85-103.
- NEZZAR-HOCINE H., PERRIN R., HALLI-HARGAS R. & CHEVALIER G., 1998 — Ectomycorrhizal associations with *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carrière : I — Mycorrhizal synthesis with *Tricholoma tridentinum* Singer var. *cedretorum* Bon. Mycorrhiza (accepté pour publication).
- PRADON V., 1994 — *Les mycorhizes des conifères*. Thèse de docteur en pharmacie, Université de Clermont-Ferrand, Faculté de pharmacie, 144 p.
- RIOUSSET L. & RIOUSSET G., 1991 — Champignons de la cédraie du Petit Lubéron. Session de journée de la F.A.M.M., Maillane, France, août 1991, 4 p.
- SINGER R., 1969 — Forest Mycology and Forest Communities in South America. II. Mycorrhiza Sociology and Fungus Succession in the *Nothofagus dombeyi*-*Austrocedrus chilensis* Woods of Patagonia. In : Hacskeylo E. (ed.), *Mycorrhizae*, Washington. USDA Misc. Publ. N° 1189, US Govt. Printing office, pp. 204-215.
- THOEN D., 1980 — Contribution à l'inventaire des mycocénoses des pessières naturelles des Vosges (France). *Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon*, 49^e année, 6 : 380-389.
- TOTH J., 1988 — Le Mont Ventoux. Document interne n° 07-1988. INRA. Recherches Forestières, Station de sylviculture méditerranéenne, Avignon, 30 p.
- TRAPPE J. M., 1962 — Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Botanical Review* 28 : 538-606.
- ZEMMOURIG., 1984 — *Contribution à l'étude systématique des Homobasidiomycètes (champignons supérieurs) de la forêt de Beni-Ghobri (Tizi-Ouzou, Algérie)*. D.E.S., Biologie Végétale, Université de Tizi-Ouzou, 54 p.

New taxa and new combinations proposed in *Cryptogamie-Mycologie* 19(1-2)

New taxa :

<i>Lactarius fennoscandicus</i> Verbeken & Vesterholt.....	87
<i>Zelleromyces hispanicus</i> Calonge & Pegler	100
<i>Zelleromyces giennensis</i> Moreno-Arroyo, Gómez & Calonge	108
<i>Tuber pseudoexcavatum</i> Wang, G. Moreno, L. J. Rioussel, J. L. Manjón & G. Rioussel.....	115

New combinations :

<i>Calvatia pygmaea</i> (R. E. Fr.) Kreisel, G. Moreno, C. Ochoa & Altés (bas. : <i>Lanopila pygmaea</i>)	132
---	-----

Cryptogamie, Mycologie is accredited with the International Association for Plant Taxonomy for the purpose of registration of new names of fungi

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

Cryptogamie, *Algologie*, *Cryptogamie*, *Bryologie-Lichénologie* et *Cryptogamie, Mycologie* publient des articles originaux ou des articles de synthèse en systématique, biologie et écologie des cryptogames (algues, bryophytes et lichens, champignons, respectivement). Les manuscrits rédigés en français, en anglais, en allemand, en espagnol et en italien, sont pris en considération dans la limite des possibilités de la Rédaction à trouver des lecteurs compétents dans ces langues. Les auteurs n'écrivant pas dans leur langue doivent, avant soumission, faire relire leur texte par une personne dont la langue du manuscrit est la langue maternelle. Il n'y a pas de limite au nombre de pages. La publication d'un article sera facilitée si les auteurs suivent soigneusement les instructions ci-après.

Les articles sont lus et critiqués par des rapporteurs spécialistes des domaines concernés. Ces rapporteurs sont choisis par la rédaction. La publication définitive des articles dépend de la rédaction. Les manuscrits non conformes aux instructions qui suivent sont retournés aux auteurs pour être corrigés, avant leur soumission au Comité de Lecture. Dès leur acceptation, les droits de reproduction des articles deviennent la propriété de la revue.

TEXTE. — Les manuscrits doivent être fournis en triple exemplaire (l'original et deux copies), dactylographiés sur une seule face, en double interligne (y compris les références et les légendes), sans rature ni surcharge, sans mots coupés et avec une marge gauche de 4 cm. Pour raccourcir les délais de parution, **il est vivement recommandé d'envoyer à la rédaction la version finale de l'article enregistrée sur disquette utilisable sous DOS (IBM) ou Macintosh ; le logiciel MS WORD est conseillé.**

Chaque manuscrit, paginé, devra comporter, dans l'ordre :

- une page comportant le titre de l'article et son éventuelle traduction en anglais comprendra les noms, prénoms et adresses des auteurs (y compris, dans la mesure du possible, les numéros de télécopie et de courrier électronique), l'auteur à qui la correspondance doit être adressée devant être précisé ; le titre courant (haut de page) de 50 signes au maximum ; une liste de mots-clés ;
- deux résumés, l'un en français (en cas de nécessité, la rédaction peut aider à sa traduction), l'autre en anglais, chacun d'eux d'environ 180 mots ou 15 lignes (non limitatif) et, éventuellement, un troisième dans la langue de l'article ; ils doivent faire ressortir les résultats essentiels exposés dans le texte ;
- le texte proprement dit, suivi des légendes des figures, des planches et des tableaux, dans cet ordre.

La présentation du texte devra faire apparaître clairement les subdivisions appropriées à la nature de l'article (par ex. Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats, Discussion, Remerciements, Références), leur hiérarchie, ainsi que le début des paragraphes. Les symboles, unités et la nomenclature doivent suivre les normes internationales ; le système SI, en particulier, doit être utilisé. La première mention du nom latin d'une espèce doit être accompagnée des noms des autorités taxinomiques. Un fascicule du journal pourra être consulté à titre d'exemple pour une plus ample information sur les conventions suivies par la revue. Les légendes des figures et des tableaux (dans la langue du manuscrit et en anglais) doivent être explicites.

RÉFÉRENCES. — La liste bibliographique devra se faire par ordre alphabétique des auteurs et chronologique par auteurs sans tenir compte des auteurs secondaires. Les titres des périodiques devront être cités en entier ; les ouvrages seront cités selon F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976..., *Taxonomic literature*. Ed. 2. Utrecht/Antwerpen : Bohn, Scheltema & Holkema. Les références devront être présentées selon les modèles suivants (noter que les noms des auteurs Chinois sont écrits en entier et dans le style du changement national effectué en Chine en 1987 ; par ex. Chang C.F. devient Zhang Jungfu) :

- AJISAKA T., NORO T., TRONO Jr. G.C., YOUNG-MENG CHIANG & YOSHIDA T., 1994 — Several *Sargassum* species (subgenus *Sargassum*) in East Asia with furcately branching leaves. In: Abbott I.A. (ed.), *Taxonomy of Economic Seaweeds*. IV. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, pp. 9-22.
- ALBRECHT A. & REISE K., 1994 — Effects of *Fucus vesiculosus* covering intertidal mussel beds in the Wadden Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 48 (2-3): 243-256.
- MAGGS C.A. & HOMMERSAND M.H., 1993 — *Seaweeds of the British Isles*. I Rhodophyta. Part 3A Ceramiales. London, HMSO Books, The Natural History Museum, 464 p.
- MONTAGNE C., 1838 — Centurie des plantes cellulaires exotiques nouvelles. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, sér. 2, 9: 38-57.

Les renvois à la liste bibliographique se feront par le nom de l'auteur et l'année de publication ; utiliser "et al." lorsque l'article est signé par plus de deux auteurs et "&" entre deux auteurs (par ex. Montagne, 1838 ; Maggs & Hommersand, 1993 ; Ajisaka et al., 1994).

ILLUSTRATIONS. — Toutes les illustrations doivent être montées sur papier blanc rigide ; les noms des auteurs et le numéro des figures doivent être indiqués au verso de chacune d'elles. Toutes les illustrations au trait doivent être originales, à l'encre de Chine, les numéros et les lettres doivent être effectués à l'aide de lettres de transfert. Les dimensions des originaux ne devront pas excéder le triple de celle de leur reproduction définitive (justification de la revue : 12,5 × 18 cm). Les illustrations au trait et les tableaux, doivent être des originaux de qualité suffisante pour la reproduction directe en offset. Les auteurs choisiront l'épaisseur des traits et la taille des caractères en fonction de la réduction éventuelle des illustrations. Les illustrations photographiques doivent être fournies en trois exemplaires originaux (ou un original et deux photocopies laser). Les documents photographiques doivent être montés par planches, à la taille de leur reproduction finale (justification maximale : 12,5 × 18 cm). Toutes les figures devront comporter les échelles (les grandissements x... sont prohibés), les symboles nécessaires à leur compréhension, et être numérotées dans l'ordre d'appel dans le texte. La publication de planches en couleurs est à la charge des auteurs.

ÉPREUVES. — Les épreuves devront être vérifiées et retournées à la rédaction dans les 48 heures suivant leur réception, par courrier et, si nécessaire, par fax. A ce stade, les possibilités de correction sont limitées aux fautes de frappe. Si des modifications aux illustrations s'avéraient nécessaires, le coût du clichage des nouveaux originaux serait à la charge des auteurs. Si les épreuves ne sont pas retournées dans les délais, l'article paraîtra sans les corrections des auteurs.

TIRÉS-À-PART : limités à 150, dont 25 gratuits. Un bon de commande pour les tirés-à-part est joint à l'envoi des épreuves.

Cryptogamie

Association des Amis des Cryptogames (ADAC), Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie (PC), 12, rue Buffon 75005 Paris France

Directeur de publication : Hélène Causse-Bischler

Cryptogamie, Algologie - Rédacteurs : Bruno de Reviers

Tél. (33) 1 40 79 31 98 - Fax (33) 1 40 79 35 94 - E-mail reviers@mnhn.fr

Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie - Rédacteur : Denis Lamy

Tél. (33) 1 40 79 31 84 - Fax (33) 1 40 79 35 94 - E-mail lamy@mnhn.fr

Cryptogamie, Mycologie - Rédacteur : Bruno Dennetière

Tél. (33) 1 40 79 31 87 - Fax (33) 1 40 79 35 94 - E-mail cryplich@mnhn.fr

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Cryptogamie, Algologie; Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie; and Cryptogamie, Mycologie publish original papers, and reviews, on the systematics, biology and ecology of cryptogams (algae; bryophytes and lichens; and fungi, respectively). Manuscripts written in French, English, German, Italian and Spanish are considered providing suitable referees fluent in the language of the manuscript are available. Authors not writing in their first language should have manuscripts checked for grammar and syntax by a suitable person before submission. There are no page limits for papers. Publication will be facilitated if authors check carefully that the manuscript and illustrations meet the requirements outlined below.

Papers are reviewed by referees in whose field the paper lies. The choice of reviewers is at the discretion of the Editor. Final responsibility for the publication of papers rests with the Editor. Manuscripts that do not conform to instructions which follow will be returned for correction prior to review. On acceptance, papers become the copyright of the journal.

TEXT. — Manuscripts should be submitted to the Editor in triplicate, including the original copy. All parts of the manuscript must be typed double-spaced (including references and legends), on one side of the paper, with left margin of 4 cm. To minimize delays in publication, **authors should send the final version of their manuscripts on floppy disks (5 1/4, 3 1/2) using the DOS (IBM) or Macintosh format. In addition, the use of MS WORD would be appreciated.**

Each manuscript should include, in order:

- A title page containing the title of the paper and, if necessary, its English translation; the complete name and address of each author (including, as much as possible, fax number and e-mail address), and author to whom correspondence should be sent; a running title of less than 50 letters, and a list of key words;

- Two abstracts, the first in French (if necessary, some help can be provided by the Editorial Office), the second in English (a third one in the language of the text is accepted), each of no more than 180 words or 15 lines, summarizing the major results of the paper;

The main text, followed by references, legends for figures, and tables, in that order.

The text should normally be divided into sections (e.g. Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References) appropriate to the nature of the paper. Indent the first line of all paragraphs. Symbols, units and nomenclature should conform to international usage. The SI system should be used throughout. The first mention of the Latin name of a species in the text should be accompanied by the nomenclatural authorities. Consult the current issue of the Journal for style of headings, sub-headings and other conventions. Legends for figures, plates and tables should be self-explanatory, and written in the language of the text and in English if it is not the language used for the text.

REFERENCES. — References should be arranged alphabetically and then chronologically by author. Journals titles should be cited in full; and books, cited according to F.A. Stafleu & R.S. Cowan, 1976.... *Taxonomic literature*. Ed. 2. Utrecht/Antwerpen: Bohn, Scheltema & Holkema. Conventions of style are provided in the following examples (note that names of Chinese authors are written in full and listed in the style in accordance with the national change made in China in 1987; e.g. Chang C.F. becomes Zhang Junfu):

AJISAKA T., NORO T., TRONO Jr. G.C., YOUNG-MENG CHIANG & YOSHIDA T., 1994 — Several *Sargassum* species (subgenus *Sargassum*) in East Asia with furcately branching leaves. In: Abbott I.A. (ed.), *Taxonomy of Economic Seaweeds*. IV. La Jolla, California Sea Grant College, University of California, pp. 9-22.

ALBRECHT A. & REISE K., 1994 — Effects of *Fucus vesiculosus* covering intertidal mussel beds in the Wadden Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 48 (2-3): 243-256.

MAGGS C.A. & HOMMERSAND M.H., 1993 — *Seaweeds of the British Isles*. 1 Rhodophyta. Part 3A Ceramiales. London, HMSO Books, The Natural History Museum, 464 p.

MONTAGNE C., 1838 — Centurie des plantes cellulaires exotiques nouvelles. *Annales des Sciences Naturelles*. Botanique, sér. 2, 9: 38-57.

In the text, references should be cited by the name of the author and the year of publication; use “*et al.*”, for more than two authors, and use “&” between two authors (e.g. Montagne, 1838; Maggs & Hommersand, 1993; Ajisaka *et al.*, 1994).

ILLUSTRATIONS. — All illustrations should be mounted on white light-weight carbocard, with author's names and figure numbers on the verso. Each line drawing should be original, clearly drawn with black India ink, and of good quality; letters and numerals must be made with a lettering device (not with a type writer). Originals should not be more than three times the size of the final reduction (12.5 × 18 cm). Both drawings and tables should be ready for direct reproduction by offset. Authors should choose very carefully the thickness of lines, and character sizes, corresponding to final reduction. Three copies of all photographic illustrations (or an original and to laser photocopies) are required. Photographic figures should be ready for same-size reproduction: maximum page size is 12.5 × 18 cm. All figures should include scale bars and symbols necessary for their understanding, and they should be numbered consecutively, according to the order cited in the text. Color plates will be published only at the authors expense.

PROOFS. — Proofs should be checked and returned by airmail (if necessary, by fax) to the Editor within 48 hours of receipt. At this stage, corrections should be restricted to those arising from typesetting errors. If changes to illustrations are necessary at proof stage, new originals would have to be supplied and the cost for re-photographing will be charged to author at the discretion of the Editor. If proofs are not returned promptly, the article will be published without the author's corrections.

REPRINTS: not more than 150, of which 25 are free copies. Reprint orders are enclosed with proofs.

Cryptogamie

Association des Amis des Cryptogames (ADAC), Muséum National d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Cryptogamie (PC), 12, rue Buffon 75005 Paris France

Director of the journal: Hélène Causse-Bischler

Cryptogamie, Algologie - Editor: Bruno de Reviere

Tel. (33) 1 40 79 31 98 - Fax (33) 1 40 79 35 94
- E-mail reviers@mnhn.fr

Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie - Editor:

Denis Lamy

Tel. (33) 1 40 79 31 84 - Fax (33) 1 40 79 35 94
- E-mail lamy@mnhn.fr

Cryptogamie, Mycologie - Editor: Bruno Denetiere

Tel. (33) 1 40 79 31 87 - Fax (33) 1 40 79 35 94
- E-mail cryplich@mnhn.fr



Commission paritaire 16-4-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 3^e trimestre 1998 - Imprimerie F. Paillart
Sortie des presses le 16 juillet 1998 - Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : D. Lamy ; Secrétaire : B. Dennetière
Trésorier : M^{me} E. Bury ; Directeur de la publication : H. Causse

Société Française de Systématique



La Société Française de Systématique réunit les systématiciens ou les personnes intéressées par la Systématique et les informe en publiant un *Bulletin*. Elle convie ses membres à des colloques annuels transdisciplinaires, au cours desquels les systématiciens et d'autres scientifiques peuvent s'exprimer et débattre.

Cotisation annuelle: 100F

*Demande d'adhésion à adresser au:
Secrétariat de la Société Française de Systématique, 45 rue Buffon, F-75005 Paris.
CCP 7-367-80 D PARIS*

La Société édite aussi la série Biosystema.

Prix TTC du Biosystema (France, Etranger): 150 FF, membre SFS : 100 FF.

- Biosystema 1 - Introduction à la systématique zoologique - (Concepts, Principes, Méthodes) par L. Matile, P. Tassy & D. Goujet. 1987.
- Biosystema 2 - Systématique Cladistique - Quelques textes fondamentaux. Glossaire. Traduction et adaptation de D. Goujet, L. Matile, P. Janvier & J.P. Hugot. 1988
- Biosystema 3 - La systématique et l'évolution de Lamarck aux théoriciens modernes. par S. Løvtrup. 1988.
- Biosystema 4 - L'analyse cladistique: problème et solutions heuristiques informatisées, par M. d'Udekem-Gevers. 1990.
- Biosystema 5 - Les introuvables de J.B. Lamarck- Discours d'ouverture du cours de zoologie et articles du Dictionnaire d'Histoire naturelle. Edition préparée par D. Goujet. 1990.
- Biosystema 6 - Systématique et Ecologie, par R. Barbault, Cl. Combes, F. Renaud, N. Le Brun & A. Dubois. Edition coordonnée par J.P. Hugot. 1991.
- Biosystema 7 - Systématique et Biogéographie Historique. Textes historiques et méthodologiques. Traduction et adaptation de P. Janvier, L. Matile & Th. Bourgoïn. 1991.
- Biosystema 8 - Systématique et Société. Edition coordonnée par G. Pasteur. 1993.
- Biosystema 9 - Les Monocotylédones, par J. Mathez. 1993.
- Biosystema 10 - Systématique botanique : problèmes actuels. Edition coordonnée par O. Poncy. 1993.
- Biosystema 11 - Systématique et Phylogénie: modèles d'évolution biologique. Edition coordonnée par P. Tassy et H. Lelièvre. 1994.
- Biosystema 12 - Phylsyst: logiciel de reconstruction phylogénétique, par I. Bichindaritz, S. Potter & B. Sigwalt †. 1994.
- Biosystema 13 - Systématique et Biodiversité. Edition coordonnée par Th. Bourgoïn. 1996.
- Biosystema 14 - Systématique et Informatique. Edition coordonnée par J. Lebbe, en préparation.

SOMMAIRE

J. PÉRREAU — Patrick JULY (6 novembre 1932-27 octobre 1997)	1
S. RAPIOR, S. BRICHÉRETTI, L. TAYLOR, Y. PLEISSIER, M. MILHAU & J. M. BÉSSIERE — Volatile components of fresh <i>Termitomyces</i> and <i>Termitomyces subterraneus</i>	18
E. GATHES — Response of <i>Aspergillus carbonarius</i> to Tween 80: Mycelial growth, protein, RNA and chitin content	28
G. PEÑAS, E. PEÑALZ, E. COLLADO, G. VICUENTAS & M. E. DÍEZ — Screening of antimicrobial activities by aquatic hyphomycetes cultured on different nutrient sources	33
P. KAISER — Sur les relations entre un basidiomycète de fond de forêt, <i>Termitomyces giganteus</i> , la microflore du sol et les végétaux supérieurs	45
Y. KOUJAL, A. ES-SAGOURI & R. DARGENT — Influence de la monodensité sur l'ultrastructure et la composition biochimique des fractions particulaires de <i>Boletus creta</i>	63
B. RANKOVIC — Populations of fungi in some reservoirs in Serbia	79
A. VERBEKEN & J. VESTERHOUT — A new <i>Termitomyces</i> species from Scandinavia in the section <i>Durantis</i>	87
J. RYVARDÉN — The genus <i>Termitomyces</i>	93
E. D. CALONGE & D. N. PEGLER — <i>Zellinomyces hispanicus</i> sp. nov. (Russulales, Elasmomycetaceae), an orange-red species, possibly related to <i>Zellinomyces sapiniae</i>	99
B. MORENO CARROVA, E. GOMÉZ & E. D. CALONGE — <i>Zellinomyces cazorlensis</i> sp. nov. (Russulales), a gasteroid fungus from the southern of Spain	107
Y. WANG, G. MORENO, F. FRIOUSSET, F. L. MANJÓN, G. RIOUSSET, G. FOURRÉ, G. DI MASSIMO, E. G. GARCÍA MONTERO & E. DÍEZ — <i>Termitomyces castanum</i> sp. nov., a new species from China, commercially used in Spain, France and Italy, with additional comments on Chinese truffles	113
E. ESTEVE-RAVENTOS, A. BANARIS, E. BÉTRAN & E. RODRIGUEZ — Estudio micológico de la reserva de la biosfera «El Camalillo» (Trías) de la Palma (Islas Canarias). IV. <i>Agaricomycotina</i> (3ª parte). Género <i>Boletus</i>	121
C. DUCHOY, G. MORENO, A. ALTES & H. KRISSEL — <i>Cavaria pygmaea</i> (Gasteromycetes) in the deserts of Baja California Sur (Mexico)	131
H. NEZZAR-HOUCHE, R. BOUDEVILLE, E. GUILBERTEAU, R. PERRIN & G. CHEVALIER — La macroflore fongique de <i>Acrotus salamao</i> (Inde) : Macrochampignons. II — Les champignons ectomycothènes d'une cèdraie du massif du Djurdj en Algérie	139
New taxa and new combinations proposed in <i>Cryptogone</i> Mycologia 1991 (2)	163
Instructions aux auteurs	165