

Année universitaire 2013-2014

Effet de l'histoire évolutive et de l'histoire d'introduction des espèces d'arbres sur les communautés fongiques de la phyllosphère



Photo : Donna Heber

Quentin BAILLAVOINE

Sous la Direction de :

Corinne VACHER, Chargée de Recherche, INRA

< corinne.vacher@pierroton.inra.fr >

Bastien CASTAGNEYROL, Chargé de Recherche, INRA - Université de Bordeaux

< bastien.castagneyrol@pierroton.inra.fr >

Laboratoire d'accueil :

UMR 1202 BIOGECO - INRA / Université de Bordeaux

Site de Recherches Forêt Bois de Pierroton 69 route d'Arcachon 33612 CESTAS Cedex – France

Introduction

Les interactions entre les plantes et les organismes associés forment des réseaux écologiques complexes. La structure de ces réseaux (*i.e.* l'identité et le nombre des espèces, ainsi que la nature et la force de leurs interactions) détermine le fonctionnement des écosystèmes, en particulier leur résilience aux perturbations (Thebault et Fontaine, 2010). Cette structure résulte d'évènements passés plus ou moins anciens (Vazquez et al., 2009). Dans le cas des interactions entre les arbres forestiers et leurs champignons parasites, il a par exemple été montré que l'histoire évolutive ancienne des espèces d'arbre (*ie.* leur phylogénie) structure fortement les interactions hôte-parasites (Brändle et Brandl, 2006; Gilbert et Webb, 2007; Vacher et al., 2008). En comparaison, leur histoire récente (les évènements d'introduction ayant eu lieu au cours des derniers siècles) semble avoir eu peu d'influence (Vacher et al., 2010). L'objectif de cette étude est d'étendre ces résultats au cas des interactions entre les espèces d'arbres et l'ensemble des champignons de la phyllosphère.

La phyllosphère correspond à l'ensemble des surfaces aériennes des plantes. Elle est principalement composée par les surfaces supérieures et inférieures des feuilles (Ruinen, 1961). Cette surface a été estimée à plus d'un milliard de km², soit environ deux fois la surface des continents (Woodward et Lomas, 2004). L'intérieur des feuilles est parfois inclus dans la définition de la phyllosphère (Morris, 2001). C'est la définition qui sera utilisée ici. Les micro-organismes vivant sur les surfaces foliaires sont appelés épiphytes tandis que les micro-organismes vivant dans le mésophylle (aussi appelé l'endosphère) sont qualifiés d'endophytes. La phyllosphère abrite un très grand nombre d'espèces fongiques (Cordier et al., 2012; Jumpponen et Jones, 2009) liées à la plante hôte par de nombreuses interactions qui se situent sur le continuum entre le mutualisme et le parasitisme, en passant par le commensalisme (Kogel et al., 2006; Newton et al., 2010).

En plus des champignons, la phyllosphère héberge une forte diversité de bactéries et quelques archées (Bulgarelli et al., 2013; Vorholt, 2012). Son étude, comme celle de la plupart des habitats microbiens, a largement bénéficié du développement des nouvelles techniques de séquençage (NTS). Celles-ci donnent désormais accès à l'ensemble des micro-organismes (cultivables et non-cultivables) présents dans un habitat. Avant l'avènement des NTS, il convenait de récupérer les souches fongiques et/ou bactériennes et de les cultiver pour les identifier ensuite. Seuls les organismes cultivables pouvaient donc être identifiés et certains

organismes à croissance lente se retrouvaient masqués par ceux se développant plus vite (Peay et al., 2008; Porras-Alfaro et Bayman, 2011; Rastogi et al., 2013). Les NTS permettent de s'affranchir de ces limites.

La phyllosphère est un habitat microbien à l'interface entre la plante et l'atmosphère. Les communautés de micro-organismes qu'elle héberge sont donc simultanément structurées par le climat et les traits de la plante hôte. Le climat régional (température, altitude, luminosité, précipitations) et le microclimat autour de la feuille (déterminé notamment par la position de la feuille dans la canopée) influencent tous les deux la structure des communautés de micro-organismes de la phyllosphère (Cordier et al., 2012; Lindow et Brandl, 2003; Vorholt, 2012). La morphologie et la physiologie de la plante hôte influencent aussi les micro-organismes de sa phyllosphère. Les traits foliaires, en particulier, jouent un rôle important. La composition biochimique des feuilles (concentration en azote et potassium, en particulier), leur morphologie, leur dureté, la présence/absence de trichomes et la structure de la cuticule (qui gouverne notamment la quantité de nutriments et d'eau à la surface de la feuille) sont autant de traits qui façonnent les communautés microbiennes de la phyllosphère (Kembel et Mueller, 2014; Knief et al., 2010; Lindow et Brandl, 2003; Reisberg et al., 2013; Turner et al., 2013; Vorholt, 2012).

Un signal phylogénétique, faible mais significatif, a été observé pour de nombreux traits foliaires chez les plantes (Baraloto et al., 2012). Ce signal phylogénétique indique une association statistique entre la proximité phylogénétique des espèces de plante et les valeurs de leurs traits phénotypiques (Revell et al., 2008). Cette tendance des espèces apparentées à avoir des traits plus similaires que des espèces éloignées sur le plan phylogénétique s'appelle le conservatisme phylogénétique (Mouquet et al., 2012). Les traits foliaires de la plante jouant un rôle déterminant dans la structure des communautés microbiennes de la phyllosphère, nous nous attendons à ce que les espèces de plantes phylogénétiquement proches hébergent des communautés de micro-organismes semblables. En d'autres termes, nous nous attendons à ce que le signal phylogénétique sur les traits foliaires des plantes se traduise par un signal phylogénétique sur la structure des communautés microbiennes de leur phyllosphère.

Pour tester cette hypothèse, nous avons échantillonné des feuilles sur plus de 80 espèces de plantes et caractérisé les communautés fongiques de la phyllosphère (CFP) en utilisant les NTS. Les CFP ont été caractérisées par leur richesse, leur diversité et leur composition

taxonomique. L'échantillonnage a été réalisé sur des espèces de plantes plantées dans un même environnement (l'Arboretum des Barres) de manière à s'affranchir des effets du climat sur la structure des CFP. Les espèces fongiques, y compris les espèces endophytes (Arnold et al., 2003), colonisent la phyllosphère des angiospermes ligneuses principalement par voie horizontale (c'est-à-dire, de plante à plante). La phyllosphère des espèces plantées dans cet arboretum a donc vraisemblablement été colonisée à partir du pool régional d'espèces fongiques. Les espèces de plante introduites, qui sont nombreuses dans cet arboretum, ont donc vraisemblablement été colonisées par des espèces fongiques avec lesquelles elles n'ont pas co-évolué. Nous nous attendons donc à ce qu'elles aient été colonisées par des espèces fongiques généralistes, d'autant plus qu'elles sont phylogénétiquement éloignées de espèces de plante natives.

Les trois hypothèses que nous testerons spécifiquement sont donc les suivantes :

- (1) La structure actuelle des CFP porte l'empreinte de l'histoire évolutive des espèces de plantes auxquelles elles sont associées, ce qui se traduit par un signal phylogénétique sur la richesse, la diversité et la composition des CFP.
- (2) Ces signaux phylogénétiques sont moins forts chez les espèces de plantes introduites que chez les espèces de plantes natives, d'autant plus que les espèces introduites sont phylogénétiquement éloignées des espèces natives.
- (3) La richesse et la diversité des CFP est supérieure chez les espèces natives, car celles-ci ont été colonisées par des espèces fongiques spécialistes, contrairement aux espèces introduites (Figure 1).

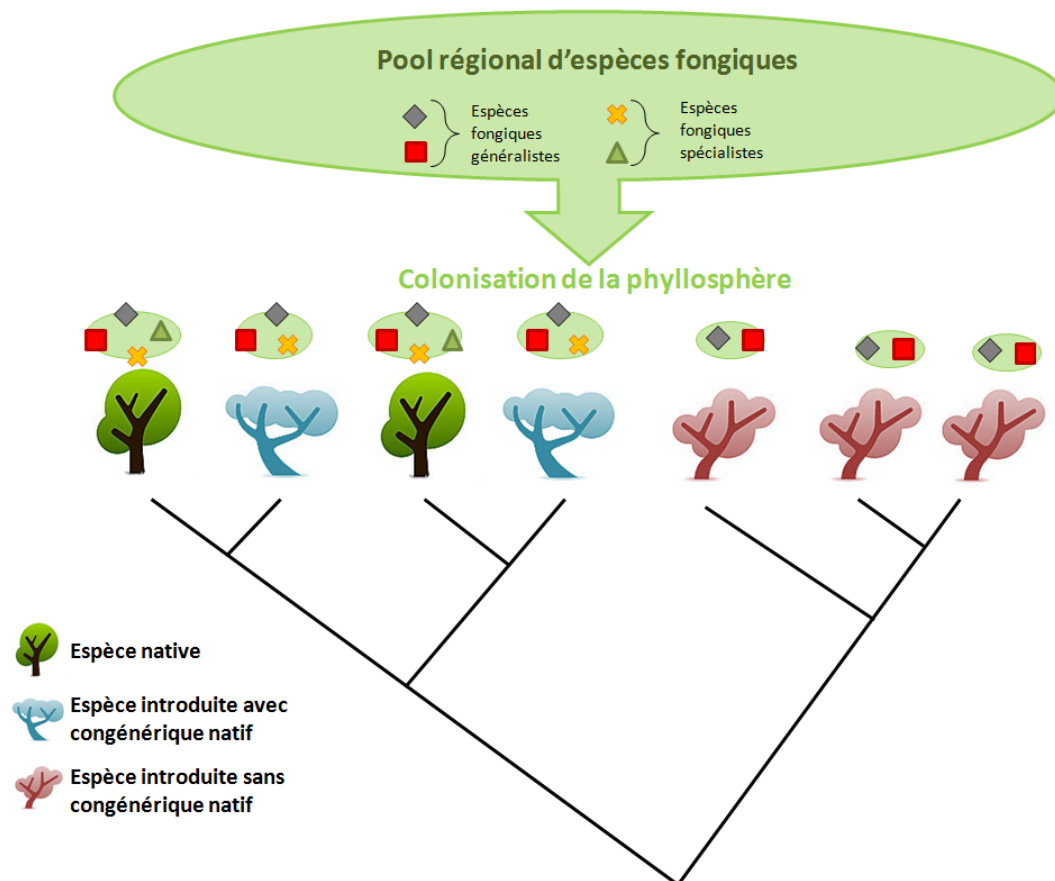


Figure 1 : Hypothèse de travail concernant la colonisation de la phyllosphère des espèces de plantes par des espèces fongiques, en fonction de la proximité phylogénétique des espèces de plantes et de leur statut d'introduction (espèces natives [N], introduites avec congénériques natifs [IA], introduites sans congénérique natif [IS]). Toutes les espèces de plantes sont colonisées par des espèces fongiques généralistes. Les espèces de plantes introduites sans congénérique natif sont colonisées uniquement par des espèces fongiques généralistes, tandis que les espèces de plante introduites mais ayant des espèces congénériques dans la flore locale sont aussi colonisées par des espèces fongiques spécialistes en fonction de leurs traits foliaires. Nous nous attendons donc à ce que la force du signal phylogénétique (SP) soit la suivante : $SP_N > SP_{IA} > SP_{IS}$. Nous nous attendons aussi à ce que la richesse (R) des communautés fongiques soit la suivante : $R_N > R_{IA} > R_{IS}$.

Matériels et méthodes

Les données acquises avant mon stage

En juillet 2012, des feuilles ont été échantillonnées sur 84 espèces de plantes (principalement des arbres) qui ont été plantées à l'état de graine à l'Arboretum des Barres (Nogent-sur-Vernisson, France). Toutes les espèces (sauf 3) sont des Angiospermes, réparties dans 22 ordres, 32 familles et 47 genres. Parmi ces Angiospermes, il y a 27 espèces natives de France (d'après la flore forestière française de Rameau), 29 espèces introduites ayant un ou plusieurs

congénériques natifs et 25 espèces introduites sans congénérique natif. Aux 81 espèces d'Angiospermes viennent s'ajouter trois espèces de Gymnospermes (*Pinus sylvestris*, *Taxus baccata* et *Ginkgo biloba*). Toutes les espèces ont été classées selon leur origine géographique : Europe (29 espèces), Asie (33 espèces) et Amériques (22 espèces).

Pour chaque espèce de plante, 4 à 16 feuilles (selon leur taille) ont été prélevées sur trois individus. Les feuilles ont été prélevées tout autour de la canopée de chaque individu de manière à limiter les effets microclimatiques sur la composition des communautés fongiques de la phyllosphère (CFP). Pour chaque espèce de plante, les trois individus échantillonnés ont été choisis selon trois critères : leur âge (entre 10 et 100 ans), l'accessibilité de leurs feuilles (accessibles à la main de préférence, ou à l'échenilloir) et leur localisation dans l'Arboretum. Dans la mesure du possible, les individus de la même espèce ont été choisis de telle sorte qu'ils étaient éloignés géographiquement dans l'Arboretum, de manière à limiter les effets spatiaux.

Pour chaque individu, l'ADN total a été extrait à partir d'une surface foliaire équivalente (4 cm² environ), prélevée sur différentes feuilles (4 au minimum). L'ITS fongique (*Internal Transcribed Spacer*), une région d'ADN ribosomique non codante et très polymorphe, a ensuite été amplifiée puis séquencé par pyroséquençage 454 sur deux *runs* d'une plateforme Roche® GS Junior. Cette région est considérée comme le code barre universel pour les champignons (Schoch et al., 2012). L'analyse bioinformatique des séquences a été réalisée à l'aide des logiciels QIIME (Caporaso et al., 2010) et USearch (Edgar, 2010). Cette analyse a permis la production d'une matrice donnant, pour chaque espèce de plante, le nombre de séquences assignées aux différentes OTUs fongiques. Une OTU, ou *Operational Taxonomic Unit*, représente un groupement de séquences ayant une homologie supérieure ou égale à un seuil, généralement fixé à 97% chez les champignons, de sorte que les OTUs correspondent à des espèces (Lindahl et al., 2013). **Cette matrice a constitué le point de départ de mon stage.**

Phylogénie des espèces de plante

Les relations phylogénétiques entre les 84 espèces de plante ont été obtenues en utilisant le logiciel Phylomatic (Webb et Donoghue, 2005), en se basant sur l'arbre phylogénétique de référence R20120829. La calibration temporelle de l'arbre phylogénétique a été réalisée en utilisant la fonction *bladj* de Phylomatic, en se basant les âges de divergence estimés par

Wikstrom et al., 2001. La racine phylogénétique est constituée par les trois espèces de Gymnospermes (Figure 2).

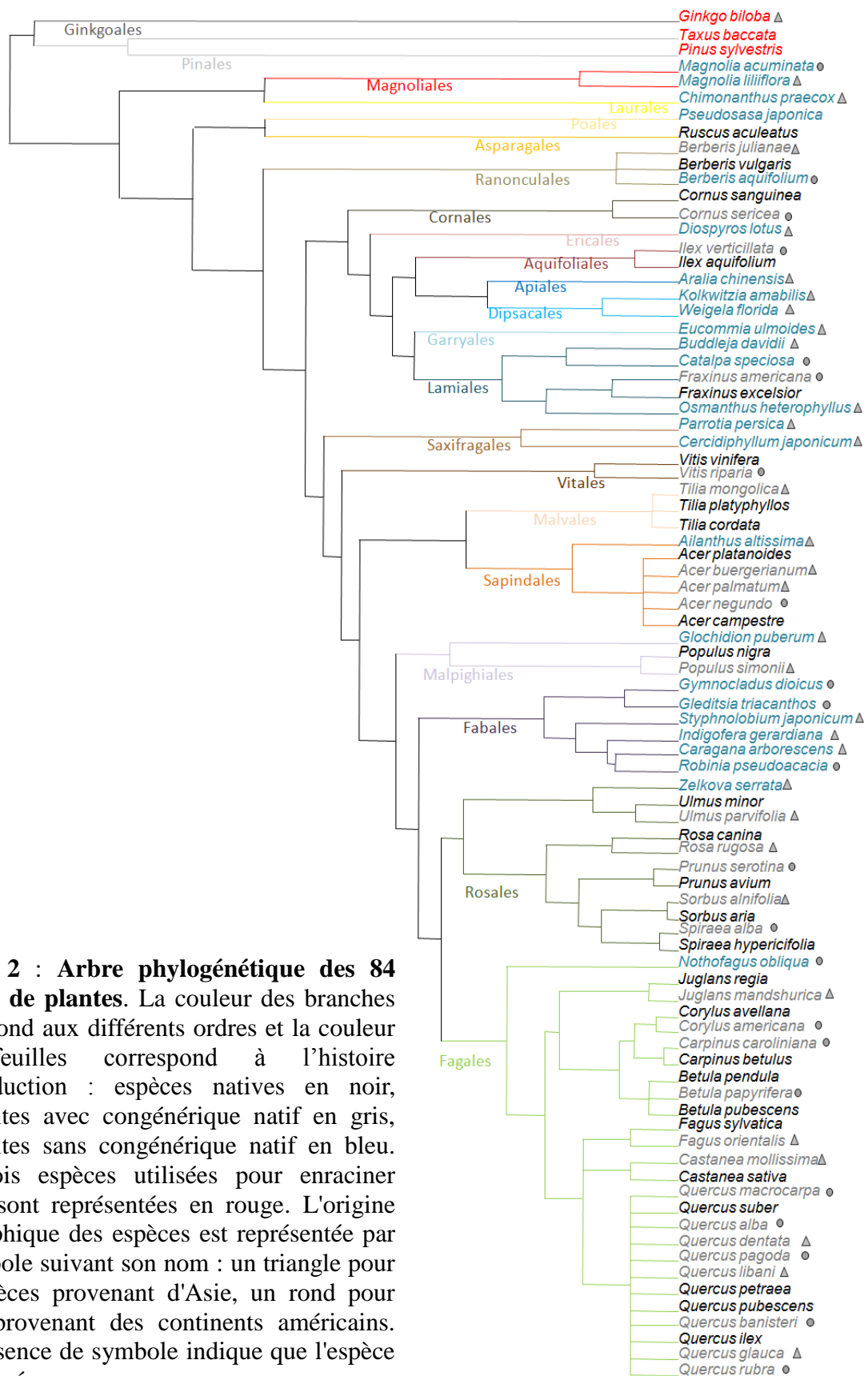


Figure 2 : Arbre phylogénétique des 84 espèces de plantes. La couleur des branches correspond aux différents ordres et la couleur des feuilles correspond à l'histoire d'introduction : espèces natives en noir, introduites avec congénérique natif en gris, introduites sans congénérique natif en bleu. Les trois espèces utilisées pour enracer l'arbre sont représentées en rouge. L'origine géographique des espèces est représentée par le symbole suivant son nom : un triangle pour les espèces provenant d'Asie, un rond pour celles provenant des continents américains. Une absence de symbole indique que l'espèce est européenne.

Caractérisation des CFP pour chaque espèce de plante

La matrice espèces de plantes × OTUs fongiques qui a constitué le point de départ de mon stage donne la distribution de 1788 OTUs fongiques sur les 84 espèces de plantes échantillonnées. Au total, 499 OTUs fongiques n'étaient représentées que par une seule séquence. Ces OTUs sont qualifiées de singletons et peuvent résulter d'un artéfact lors de l'amplification et du séquençage de l'ADN. Ces singletons ont donc été exclus du jeu de données (Figure 3).

Le nombre total de séquences par échantillon était très variable, allant de 1335 à 4792. Afin de limiter les biais liés à ces variations de la profondeur de séquençage, la matrice d'OTUs (exempte de singletons) a été raréfiée cent fois au seuil de 1335 séquences par échantillon en utilisant la fonction *rrarefy* du package R *vegan*.

En suivant Unterseher et al., 2013, nous avons défini les OTUs « cœur » (*core* en anglais) comme des OTUs présentes dans plus de la moitié des échantillons. Il s'agit donc d'espèces fongiques généralistes, présentes sur plus de la moitié des espèces de plantes échantillonnées. Les autres OTUs, dites satellites, sont des espèces plus spécialistes. Les raréfactions multiples ont été réalisées sur ces deux sous-échantillons de la matrice d'OTUs, l'un contenant uniquement les OTUs « cœur » et l'autre contenant uniquement les OTUs satellites. Le seuil de raréfaction a été fixé à 550 séquences par échantillon pour la matrice des OTUs « cœur » et 97 séquences par échantillon pour la matrice des OTUs satellites.

Sur chaque matrice raréfiée, quatre indices ont été calculés pour décrire la structure des CFP :

- (1) la richesse spécifique, qui correspond au nombre d'OTUs pour chaque espèce de plante.
- (2) la diversité spécifique, évaluée par l'indice de Simpson. Cet indice a été identifié comme étant le plus robuste aux variations de la profondeur de séquençage (Gihring et al., 2012).
- (3) un indice synthétique de composition des communautés prenant en compte l'abondance relative des différentes OTUs.
- (4) un indice synthétique de composition des communautés prenant uniquement en compte la présence/absence des différentes OTUs.

Les deux premiers indices ont été calculés respectivement grâce aux fonctions *specnumber* et *diversity* du package R *vegan*. La moyenne des valeurs obtenues pour les cent matrices raréfiées a ensuite été calculée, de manière à obtenir une valeur moyenne de richesse et une valeur moyenne de

diversité pour chaque espèce de plante.

Les deux autres indices ont été calculés en représentant la distance écologique entre espèces de plantes sur une PCoA et en projetant les coordonnées de chaque espèce de plante sur l'axe expliquant la plus grande part de variance. La distance écologique entre espèces de plante a été définie comme la dissimilarité des communautés fongiques, calculée avec la fonction *vegdist* du package R *vegan*. L'indice de dissimilarité utilisé est celui de Canberra, choisi grâce à la fonction *rankindex*. L'ordination a été réalisée grâce à la fonction *cmdscale* du package R *stats*, à partir de la matrice de distance moyenne (calculée à partir des 100 matrices raréfiées).

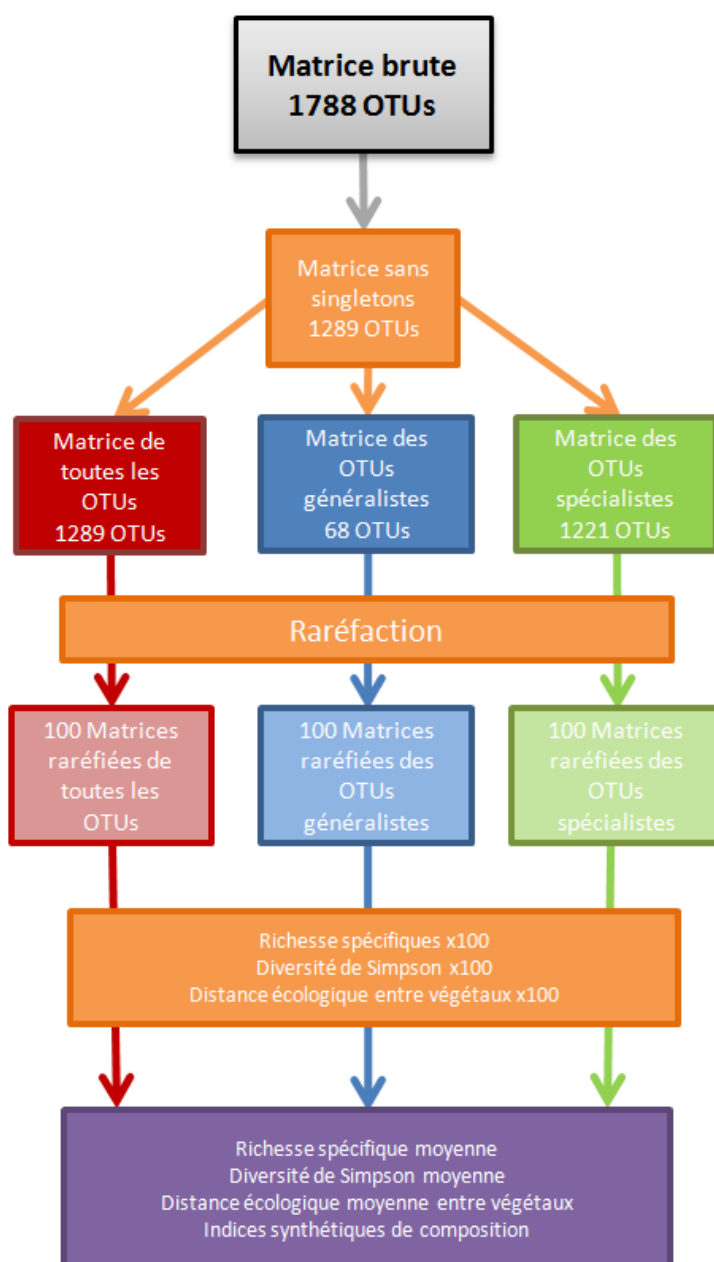


Figure 3 : Méthode utilisée pour décrire la structure des CFP associée à chaque espèce de plante, à partir de la matrice brute donnant le nombre de séquences de chaque OTU fongique sur chaque espèce de plante.

Evaluation du signal phylogénétique sur la structure des CFP

En suivant Elias et al.(2013), le signal phylogénétique sur la composition des CFP a tout d'abord été évalué en testant la corrélation entre la distance écologique entre espèces de plantes et leur distance phylogénétique. La fonction utilisée pour calculer cette corrélation est la fonction *mantel.rtest* du package *ade4*, avec 1000 permutations pour évaluer la significativité de la corrélation. Le test de Mantel est approprié aux données exprimées sous forme de distances entre paires d'espèces (Harmon et Glor, 2010).

Cette première analyse a été complétée en testant statistiquement l'association entre la phylogénie des espèces de plantes et les quatre descripteurs de la structure des CFP (la richesse spécifique, la diversité spécifique et les deux indices de composition spécifique). N'ayant pas d'*a priori* sur la vitesse d'évolution des traits considérés (c'est-à-dire, structure des CFP), nous avons privilégié un indice d'évaluation du signal phylogénétique sans modèle sous-jacent d'évolution des traits (Münkemüller et al., 2012) : le C_{mean} d'Abouheif. Nous avons en parallèle utilisé deux autres indices qui sont classiquement utilisés pour évaluer les signaux phylogénétiques. Ces deux indices sont le K de Blomberg et le λ de Pagel, qui sont basés sur un modèle Brownien d'évolution des traits (Münkemüller et al., 2012). Le K de Blomberg et le λ de Pagel ont été calculé avec la fonction *phylosig* du package R *phytools*, tandis que le C_{mean} d'Abouheif a été calculé avec la fonction *abouheif.moran* du package *adephylo*.

Nous avons également cherché à identifier le niveau taxinomique auquel se fait la différenciation des CFP. Nous avons étudié l'effet de l'ordre, de la classe et du genre sur la distance écologique entre espèces de plante. Pour cela, nous avons réalisé une analyse de variance multivariée par permutations (PERMANOVA) qui respecte la structure emboîtée (*i.e.* la taxinomie) des données. Cette analyse a été réalisée avec la fonction *adonis* du package *vegan* avec 1000 permutations. Cette méthode décompose variance de manière séquentielle : d'abord la variance expliquée par le niveau taxinomique le plus élevé, puis la variance résiduelle expliquée par le niveau taxinomique inférieur, et ce jusqu'au dernier niveau taxinomique.

Effet du statut d'introduction et de l'origine géographique des espèces de plantes sur la structure des CFP

Les effets du statut d'introduction des espèces de plantes (espèce native, introduite avec congénérique natif ou introduite sans congénérique natif) sur la structure des CFP (richesse spécifique, diversité spécifique et composition spécifique) ont également été quantifiés. Nous avons utilisé un modèle GLS (*Generalized Least Square*), qui est un modèle linéaire permettant de prendre en compte la non-indépendance des données imposée par la phylogénie des plantes hôtes en modélisant l'erreur avec une structure de corrélation dépendante de la distance phylogénétique entre paires d'espèces. Nous avons ajusté les différents modèles grâce à la fonction *gls* du package *nlme*

Résultats

Evaluation du signal phylogénétique dans la structure des CFP

Les tests de Mantel mettent en évidence une corrélation significative entre la distance phylogénétique des espèces de plantes et la dissimilarité de composition des CFP. Cette corrélation est significative lorsque l'on considère l'abondance relative des espèces fongiques (Figure 4), ou bien uniquement leur présence-absence (Figure S4 dans les matériels supplémentaires). Elle est aussi significative lorsque l'on considère uniquement les espèces de plantes natives. En revanche elle ne l'est pas lorsque l'on considère uniquement les espèces de plantes introduites. L'effet de la phylogénie des plantes est essentiellement porté par les espèces fongiques spécialistes. En revanche elle ne l'est pas lorsque l'on considère uniquement les espèces fongiques généralistes. (Figure 4). Ces résultats sont robustes au seuil choisi pour classer les espèces fongiques dans la catégorie spécialiste ou généraliste (Figures S4 bis).

L'effet de la phylogénie des espèces de plantes sur la composition des CFP est confirmé par les trois indices de mesure du signal phylogénétique. En revanche, il n'y a pas d'effet de la phylogénie sur la richesse et la diversité des CFP (Tableau 1).

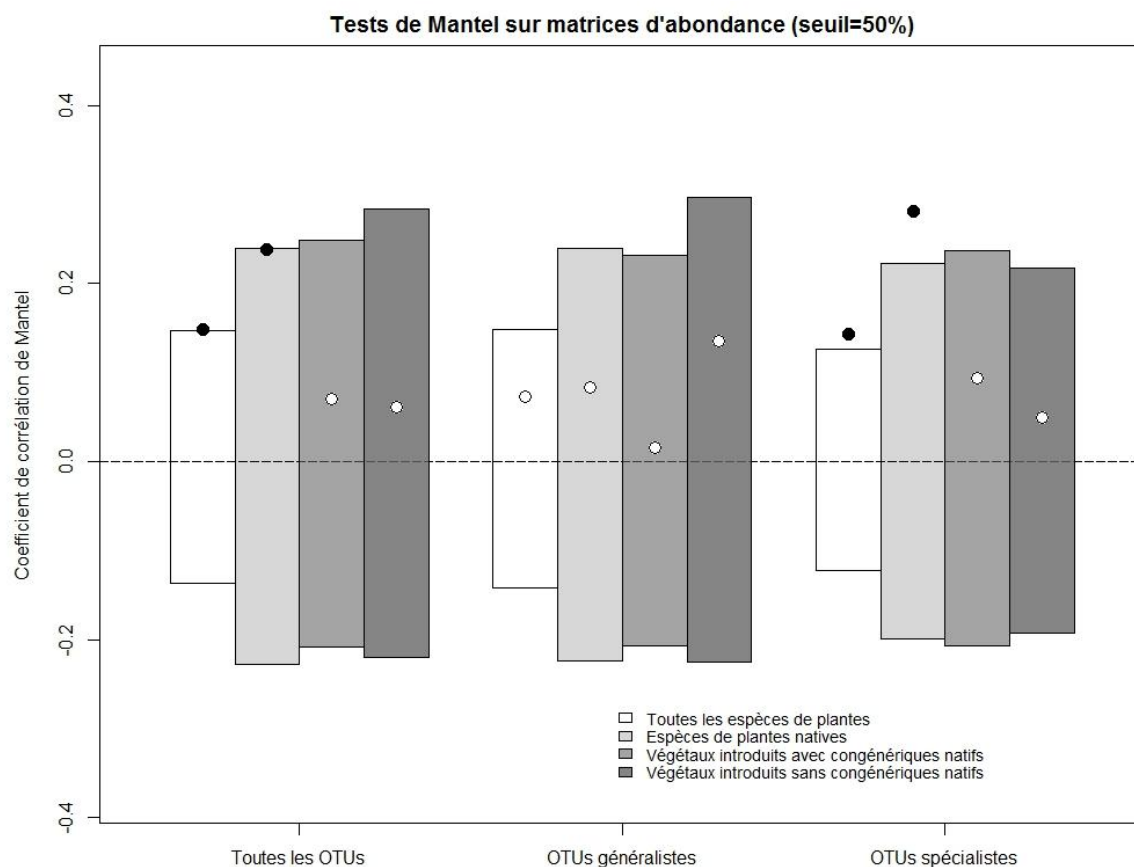


Figure 4 : Corrélations de Mantel entre la distance phylogénétique entre espèces de plantes et leur distance écologique (définie comme la dissimilarité de composition des CFP). Les rectangles représentent la distribution des 1000 coefficients de corrélation simulés par permutation sous l'hypothèse nulle. Les cercles représentent le coefficient de corrélation observé. Les valeurs de r incluses dans la distribution théorique sous H_0 ne sont pas significativement différentes de zéro (cercles blancs). Les cercles noirs indiquent un signal phylogénétique significatif sur la composition des CFP associées aux espèces de plantes.

Nos résultats montrent aussi que chaque niveau taxinomique des espèces de plantes contribue à expliquer une part significative de la variance dans la composition des communautés fongiques (Tableau 2). L'ordre est le niveau taxinomique qui explique le plus de variance (19.1%), suivi par le genre (12.5%) puis la famille (5.9%). Les différents niveaux taxinomiques, dans leur ensemble, expliquent 37.5 % de la variance dans la structure des CFP (Tableau 2).

Tableau 1 : Signaux phylogénétiques sur la richesse, diversité et composition des CFP, évalués à l'aide de trois indices (K de Blomberg,, λ de Pagel et C_{mean} d'Abouheif). Les résultats significatifs sont marqués en gras. Les indices de composition proviennent de la projection des coordonnées des espèces de plantes sur le premier axe de deux PCoAs (réalisées avec les matrices de distances écologiques à partir des matrices d'abondances et de présence-absence). Pour l'indice de composition sur base de matrice d'abondance, l'information totale portée par le premier axe pour respectivement toutes les OTUs, les OTUs généralistes et les OTUs spécialistes est de 4,4%, 8,1% et 2,7%. Pour l'indice de composition sur base de matrice de présence-absence, nous obtenons 6%, 13% et 3,5%.

Variable de réponse	OTUs	C_{mean}	P-value	K	P-value	λ	P-value
Richesse spécifique	Toutes	-0.013	0.823	0.127	0.139	< 0.01	1
	Généralistes	-0.009	0.363	0.12	0.221	< 0.01	1
	Spécialistes	-0.01	0.579	0.108	0.365	< 0.01	1
Indice de diversité de Simpson	Toutes	-0.009	0.442	0.091	0.709	< 0.01	1
	Généralistes	-0.01	0.596	0.118	0.275	< 0.01	1
	Spécialistes	-0.015	0.386	0.085	0.787	< 0.01	1
Indice de composition (matrice d'abondances)	Toutes	-0.03	0.002	0.137	0.068	0.446	0.016
	Généralistes	-0.024	0.008	0.158	0.029	0.508	0.066
	Spécialistes	-0.03	0.002	0.156	0.028	0.526	0.007
Indice de composition (matrice de présence-absence)	Toutes	-0.032	0.001	0.156	0.023	0.484	0.005
	Généralistes	-0.027	0.005	0.154	0.036	0.516	0.02
	Spécialistes	-0.034	0.001	0.184	0.005	0.561	0.001

Tableau 2 : Effet de la taxinomie sur la distance écologique entre espèces de plantes. L'ordre, la classe et le genre sont les trois niveaux taxinomiques emboîtés testés dont l'effet sur la distance écologique totale a été quantifié à l'aide d'une PERMANOVA. Le R^2 représente la part de variance expliquée par chaque niveau taxinomique, le R^2 cumulé représentant la part de variance expliquée lorsque l'on rajoute un niveau d'emboîtement. Toutes les espèces de plantes et toutes les OTUs sont prises en compte dans cette analyse.

Variabiles emboîtées	R^2	R^2 Cumulé	P-value
Ordre	0.191	0.191	0.001
Famille	0.059	0.25	0.002
Genre	0.125	0.375	0.048
Résidus	0.625	1	

Effet du statut d'introduction et de l'origine géographique sur la structure des CFP

Le statut d'introduction des espèces de plantes (espèce native, introduite avec congénérique natif ou introduite sans congénérique natif) a un effet significatif sur la richesse spécifique des OTUs spécialistes (Tableau 3). Les espèces de plantes natives hébergent en moyenne 36 OTUs spécialistes, contre 44 pour les espèces introduites n'ayant pas de congénériques natifs. Les espèces de plantes introduites ayant des congénériques dans la flore française occupent une position

intermédiaire, avec en moyenne 40 OTUs par essence (Figure 5). En revanche, le statut d'introduction n'a pas effet sur la richesse en OTUs généralistes et sur la richesse totale. L'origine d'introduction (Europe, Amériques et Asie) n'a aucun effet sur la richesse en OTUs (Tableau 3).

Le statut d'introduction et l'origine géographique n'ont pas d'effet sur la diversité et la composition des communautés fongiques (Tableau S3)

Tableau 3 : Effets du statut et de l'origine d'introduction des espèces de plantes sur la richesse spécifique des CFP, évalués à l'aide de modèles GLS. Les résultats significatifs sont marqués en gras.

OTUs	Variables de réponse	ΔAIC	Rapport des vraisemblances	P-value
Toutes	Statut	3.413	0.587	0.746
	Origine	0.635	3.365	0.186
Généralistes	Statut	3.636	0.364	0.834
	Origine	2.672	1.328	0.515
Spécialistes	Statut	2.386	6.386	0.041
	Origine	1.7	5.7	0.058

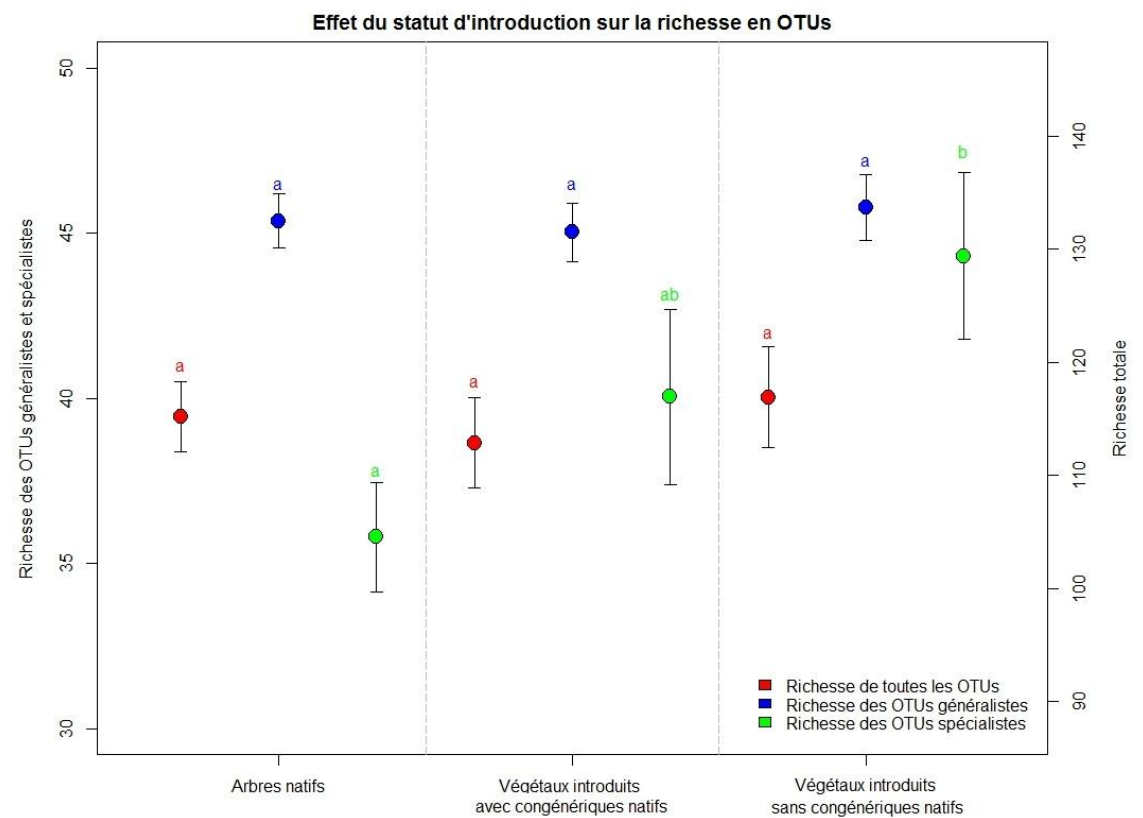


Figure 5 : Effets du statut d'introduction sur la richesse en OTUs. Pour chaque variable de réponse, les points surmontés de la même lettre ne sont pas significativement différents.

Discussion

Conformément à notre première hypothèse, nous avons montré que la structure actuelle des communautés fongiques de la phyllosphère (CFP) porte l'empreinte de l'histoire évolutive des plantes auxquelles elles sont associées. Nos résultats montrent un signal phylogénétique significatif sur la composition des CFP, ce qui signifie que deux espèces de plantes partagent des CFP d'autant plus semblables qu'elles sont proches phylogénétiquement. En revanche, il n'y a pas d'effet de la phylogénie des espèces de plantes sur la richesse ou la diversité des CFP. Les traits foliaires phylogénétiquement conservés (Baraloto et al., 2012) semblent donc gouverner la composition des CFP, mais pas leur richesse ou leur diversité. Nous ne disposons malheureusement pas de mesures de traits foliaires qui permettraient d'identifier quels sont ceux qui structurent les CFP.

Conformément à notre deuxième hypothèse, le signal phylogénétique sur la composition des CFP est le plus fort chez les espèces hôtes natives et le plus faible chez les espèces introduites sans congénériques natifs. Seul le signal phylogénétique porté par les CFP des espèces natives est significatif. Cependant, le plus faible signal phylogénétique observé chez les espèces de plantes introduites ne semble pas être lié au fait qu'elles sont colonisées par moins d'espèces fongiques spécialistes. Contrairement à notre troisième prédiction, la richesse en espèces fongiques spécialistes est plus forte pour les espèces de plantes introduites que pour les espèces de plantes natives. Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette richesse en espèces fongiques spécialistes plus importante chez les espèces de plantes introduites :

- Les espèces de plantes introduites n'ont pas que le pool régional d'espèces fongiques à leur disposition, et possèdent une réserve de champignons supplémentaire probablement transmise par voie verticale (Vorholt, 2012). Ces nouvelles espèces fongiques, introduites avec la plante hôte, pourraient s'ajouter aux champignons natifs de l'aire d'introduction. Ce serait particulièrement le cas pour des plantes introduites à partir de milieux dans lesquels la diversité des champignons spécialistes serait plus élevée qu'en France.
- Les espèces fongiques spécialistes ont été définies uniquement par rapport à notre jeu de données. Les champignons associés à une seule espèce de plante ont été ainsi qualifiés de spécialistes, sans que cela ne préjuge du niveau de spécificité de l'espèce fongique correspondante vis-à-vis de l'arbre hôte dans son aire de distribution originale. On ne peut pas exclure que la plus grande richesse des espèces de champignons spécialistes sur les espèces exotiques ne soit pas artéfactuelle.

En suivant Elias et al. (2013) et Münkemüller et al. (2012), plusieurs analyses ont été réalisées pour évaluer les signaux phylogénétiques sur la structure des CFP. Les résultats des différentes analyses vont qualitativement dans le même sens. Les tests de Mantel semblent être les plus fiables car l'ensemble de la distance écologique entre espèces de plantes est prise en compte. Les analyses de signaux phylogénétiques sur les indices synthétiques de composition (issus de la projection des espèces sur les axes d'une ordination) sont à considérer avec circonspection étant donné que ces indices représentent une faible part de la variance de la distance écologique entre espèces de plantes.

Afin d'étudier le lien entre l'histoire évolutive des espèces de plantes et la structure des communautés associées, nous avons aussi utilisé la taxinomie comme proxy de la phylogénie. Nos résultats montrent qu'une grande partie de la variance (37,5%) de la composition des CFP entre espèces de plantes est expliquée par la taxinomie. Comme l'ont montré Kembel and Mueller (2014) en forêt tropicale, nos résultats montrent que l'ordre explique la plus grande part de la variance. Cependant la famille est le niveau taxinomique le moins explicatif, contre le genre pour Kembel and Mueller (2014). Notons également que Lambais et al. (2014) ont également mis en évidence un effet de la taxinomie des espèces de plantes sur la structure des communautés bactériennes de la phyllosphère, dans une forêt tropicale au Brésil.

Pour conclure, les espèces de plantes proches sur le plan phylogénétique tendent à posséder des communautés fongiques foliaires similaires. Ce signal phylogénétique que nous avons trouvé sur la structure des CFP est dû aux espèces fongiques spécialistes, et est plus marqué pour les espèces de plantes natives que pour les introduites. Dans l'arboretum des Barres, les espèces introduites possèdent une richesse en champignons spécialistes importante, probablement d'origine artificielle. Dans une étude future, un plus grand nombre de données en relation avec les espèces de plantes nous permettrait d'en savoir plus sur le lien entre la phylogénie des espèces de plantes et la structure des CFP. Il s'agirait principalement de traits foliaires, comme la durée de vie de celles-ci, leur composition biochimique, leur dureté, ou bien l'âge de l'hôte, l'ensoleillement reçu, autant de facteurs écologiques connus pour affecter les communautés de micro-organismes de la phyllosphère (Andrews and Harris, 2000; Lindow and Brandl, 2003; Turner et al., 2013; Vorholt, 2012).

Remerciements

J'aimerais remercier tout particulièrement Corinne VACHER et Bastien CASTAGNEYROL pour m'avoir permis d'intégrer leurs équipes pendant ces six mois, pour leurs conseils et leur gentillesse. Je remercie aussi tous les membres de l'équipe GEMFOR et de l'équipe Entomo pour leur accueil. Je remercie également Boris, Guillaume, Zsuzsanna et Pili pour avoir oeuvré à la bonne humeur générale dans le bureau.

Bibliographie

- Andrews, J.H., Harris, R.F., 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38, 145–180.
- Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 15649–15654.
- Baraloto, C., Hardy, O.J., Paine, C.E.T., Dexter, K.G., Cruaud, C., Dunning, L.T., Gonzalez, M.-A., Molino, J.-F., Sabatier, D., Savolainen, V., Chave, J., 2012. Using functional traits and phylogenetic trees to examine the assembly of tropical tree communities: *Assembly of tropical tree communities*. *J. Ecol.* 100, 690–701. doi:10.1111/j.1365-2745.2012.01966.x
- Brändle, M., Brandl, R., 2006. Is the composition of phytophagous insects and parasitic fungi among trees predictable? *Oikos* 113, 296–304. doi:10.1111/j.2006.0030-1299.14418.x
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120106
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Tumbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336. doi:10.1038/nmeth.f.303
- Cordier, T., Robin, C., Capdevielle, X., Desprez-Loustau, M.-L., Vacher, C., 2012. Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecol.* 5, 509–520. doi:10.1016/j.funeco.2011.12.004
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461
- Elias, M., Fontaine, C., Frank van Veen, F.J., 2013. Evolutionary History and Ecological Processes Shape a Local Multilevel Antagonistic Network. *Curr. Biol.* 23, 1355–1359. doi:10.1016/j.cub.2013.05.066
- Gihring, T.M., Green, S.J., Schadt, C.W., 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ. Microbiol.* 14, 285–290. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02550.x
- Gilbert, G.S., Webb, C.O., 2007. Phylogenetic signal in plant pathogen-host range. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 4979–4983. doi:10.1073/pnas.0607968104

- Harmon, L.J., Glor, R.E., 2010. POOR STATISTICAL PERFORMANCE OF THE MANTEL TEST IN PHYLOGENETIC COMPARATIVE ANALYSES. *Evolution*. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.00973.x
- Jumpponen, A., Jones, K.L., 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytol.* 184, 438–448. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02990.x
- Kembel, S.W., Mueller, R.C., 2014. Plant traits and taxonomy drive host associations in tropical phyllosphere fungal communities¹. *Botany* 92, 303–311. doi:10.1139/cjb-2013-0194
- Knief, C., Frances, L., Vorholt, J.A., 2010. Competitiveness of Diverse Methylobacterium Strains in the Phyllosphere of Arabidopsis thaliana and Identification of Representative Models, Including M. extorquens PA1. *Microb. Ecol.* 60, 440–452. doi:10.1007/s00248-010-9725-3
- Kogel, K.-H., Franken, P., Hückelhoven, R., 2006. Endophyte or parasite – what decides? *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 358–363. doi:10.1016/j.pbi.2006.05.001
- Lambais, M.R., Lucheta, A.R., Crowley, D.E., 2014. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. *Microb. Ecol.* doi:10.1007/s00248-014-0433-2
- Lindahl, B.D., Nilsson, R.H., Tedersoo, L., Abarenkov, K., Carlsen, T., Kjølner, R., Kõljalg, U., Pennanen, T., Rosendahl, S., Stenlid, J., Kauserud, H., 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers - a user's guide. *New Phytol.* 199, 288–299. doi:10.1111/nph.12243
- Lindow, S.E., Brandl, M.T., 2003. Microbiology of the Phyllosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1875–1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Morris, C.E., 2001. Phyllosphere. *eLS*.
- Mouquet, N., Devictor, V., Meynard, C.N., Munoz, F., Bersier, L.-F., Chave, J., Coutron, P., Dalecky, A., Fontaine, C., Gravel, D., Hardy, O.J., Jabot, F., Lavergne, S., Leibold, M., Mouillot, D., Münkemüller, T., Pavoine, S., Prinzing, A., Rodrigues, A.S.L., Rohr, R.P., Thébaud, E., Thuiller, W., 2012. Ecophylogenetics: advances and perspectives. *Biol. Rev.* 87, 769–785. doi:10.1111/j.1469-185X.2012.00224.x
- Münkemüller, T., Lavergne, S., Bzeznik, B., Dray, S., Jombart, T., Schiffrers, K., Thuiller, W., 2012. How to measure and test phylogenetic signal: How to measure and test phylogenetic signal. *Methods Ecol. Evol.* 3, 743–756. doi:10.1111/j.2041-210X.2012.00196.x
- Newton, A.C., Fitt, B.D.L., Atkins, S.D., Walters, D.R., Daniell, T.J., 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends Microbiol.* 18, 365–373. doi:10.1016/j.tim.2010.06.002
- Peay, K.G., Kennedy, P.G., Bruns, T.D., 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience* 58, 799–810.
- Porrás-Alfaro, A., Bayman, P., 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49, 291–315. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081831
- Rastogi, G., Coaker, G.L., Leveau, J.H.J., 2013. New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches. *FEMS Microbiol. Lett.* 348, 1–10. doi:10.1111/1574-6968.12225
- Reisberg, E.E., Hildebrandt, U., Riederer, M., Hentschel, U., 2013. Distinct Phyllosphere Bacterial Communities on Arabidopsis Wax Mutant Leaves. *Plos One* 8, e78613. doi:10.1371/journal.pone.0078613
- Revell, L., Harmon, L., Collar, D., 2008. Phylogenetic Signal, Evolutionary Process, and Rate. *Syst. Biol.* 57, 591–601. doi:10.1080/10635150802302427
- Ruinen, J., 1961. The phyllosphere. *Plant Soil* 15, 81–109. doi:10.1007/BF01347221
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.D., Bai, F.Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bögale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., Cai, Q., Cardinali, G., Chaverri, P., Coppins, B.J., Crespo, A., Cubas P, P., Cummings, C., Damm, U., de Beer, Z.W., de

- Hoog, G.S., Del-Prado, R., Dentinger, B., Dieguez-Uribeondo, J., Divakar, P.K., Douglas, B., Duenas, M., Duong, T.A., Eberhardt, U., Edwards, J.E., Elshahed, M.S., Fliegerova, K., Furtado, M., Garcia, M.A., Ge, Z.W., Griffith, G.W., Griffiths, K., Groenewald, J.Z., Groenewald, M., Grube, M., Gryzenhout, M., Guo, L.D., Hagen, F., Hambleton, S., Hamelin, R.C., Hansen, K., Harrold, P., Heller, G., Herrera, G., Hirayama, K., Hirooka, Y., Ho, H.M., Hoffmann, K., Hofstetter, V., Hognabba, F., Hollingsworth, P.M., Hong, S.B., Hosaka, K., Houbroken, J., Hughes, K., Huhtinen, S., Hyde, K.D., James, T., Johnson, E.M., Johnson, J.E., Johnston, P.R., Jones, E.B., Kelly, L.J., Kirk, P.M., Knapp, D.G., Koljalg, U., Kovacs, G.M., Kurtzman, C.P., Landvik, S., Leavitt, S.D., Liggenstoffer, A.S., Liimatainen, K., Lombard, L., Luangsa-Ard, J.J., Lumbsch, H.T., H, M., Maharachchikumbura, S.S., Martin, M.P., May, T.W., McTaggart, A.R., Methven, A.S., Meyer, W., Moncalvo, J.M., Mongkol-samrit, S., Nagy, L.G., Nilsson, R.H., Niskanen, T., Nyilasi, I., Okada, G., Okane, I., Olariaga, I., Otte, J., Papp, T., Park, D., Petkovits, T., Pino-Bodas, R., Quaedvlieg, W., Raja, H.A., Redecker, D., Rintoul, T., Ruibal, C., Sarmiento-Ramirez, J.M., Schmitt, I., Schussler, A., Shearer, C., Sotome, K., Stefani, F.O., Stenroos, S., Stielow, B., Stockinger, H., Suetrong, S., Suh, S.O., Sung, G.H., Suzuki, M., Tanaka, K., Tedersoo, L., Telleria, M.T., Tretter, E., Untereiner, W.A., Urbina, H., Vagvolgyi, C., Vialle, A., Vu, T.D., Walther, G., Wang, Q.M., Wang, Y., Weir, B.S., Weiss, M., White, M.M., Xu, J., Yahr, R., Yang, Z.L., Yurkov, A., Zamora, J.C., Zhang, N., Zhuang, W.Y., Schindel, D., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.1117018109
- Thebault, E., Fontaine, C., 2010. Stability of Ecological Communities and the Architecture of Mutualistic and Trophic Networks. *Science* 329, 853–856. doi:10.1126/science.1188321
- Turner, T.R., James, E.K., Poole, P.S., 2013. The plant microbiome. *Genome Biol* 14, 1186.
- Unterseher, M., Gazis, R., Chaverri, P., Guarniz, C.F.G., Tenorio, D.H.Z., 2013. Endophytic fungi from Peruvian highland and lowland habitats form distinctive and host plant-specific assemblages. *Biodivers. Conserv.* 22, 999–1016. doi:10.1007/s10531-013-0464-x
- Vacher, C., Daudin, J.-J., Piou, D., Desprez-Loustau, M.-L., 2010. Ecological integration of alien species into a tree-parasitic fungus network. *Biol. Invasions* 12, 3249–3259. doi:10.1007/s10530-010-9719-6
- Vacher, C., Vile, D., Helion, E., Piou, D., Desprez-Loustau, M.-L., 2008. Distribution of parasitic fungal species richness: influence of climate versus host species diversity. *Divers. Distrib.* 14, 786–798. doi:10.1111/j.1472-4642.2008.00479.x
- Vazquez, D.P., Bluthgen, N., Cagnolo, L., Chacoff, N.P., 2009. Uniting pattern and process in plant-animal mutualistic networks: a review. *Ann. Bot.* 103, 1445–1457. doi:10.1093/aob/mcp057
- Vorholt, J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840. doi:10.1038/nrmicro2910
- Wikstrom, N., Savolainen, V., Chase, M.W., 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 2211–2220. doi:10.1098/rspb.2001.1782
- Woodward, F.I., Lomas, M.R., 2004. Vegetation dynamics – simulating responses to climatic change. *Biol. Rev.* 79, 643–670. doi:10.1017/S1464793103006419

Annexes

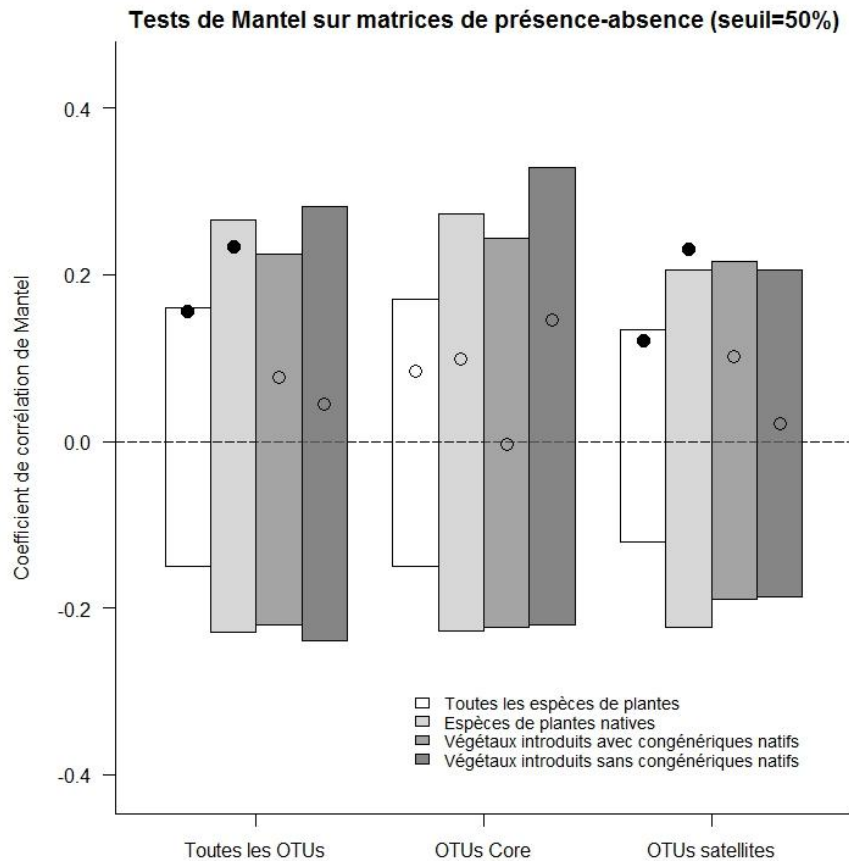
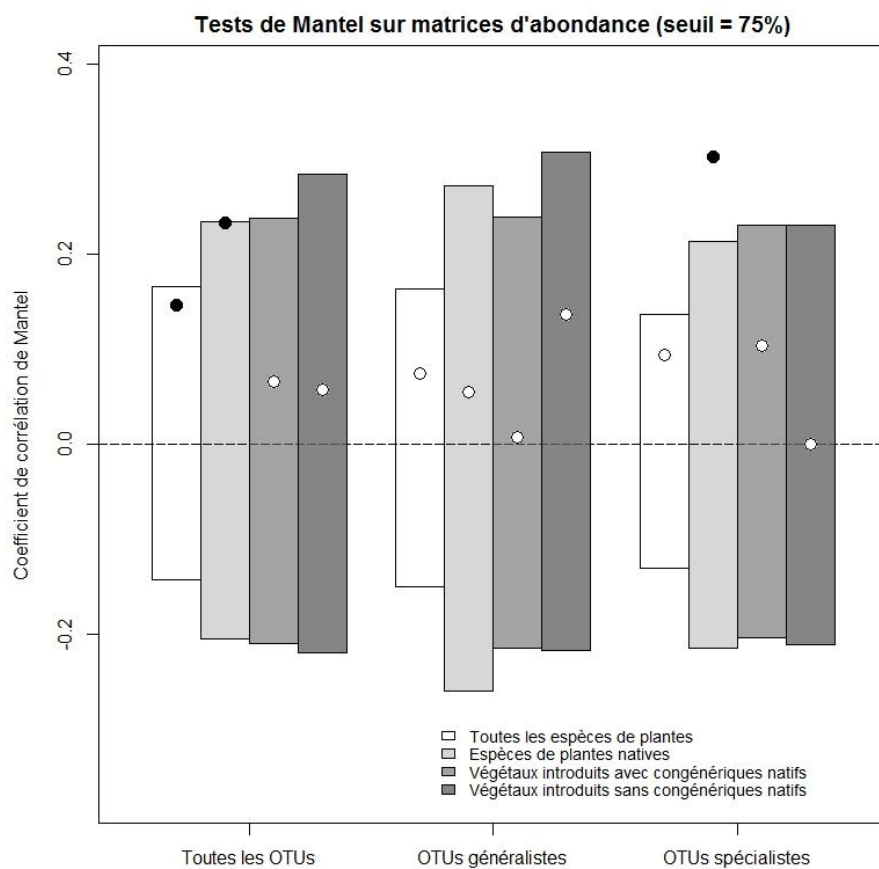
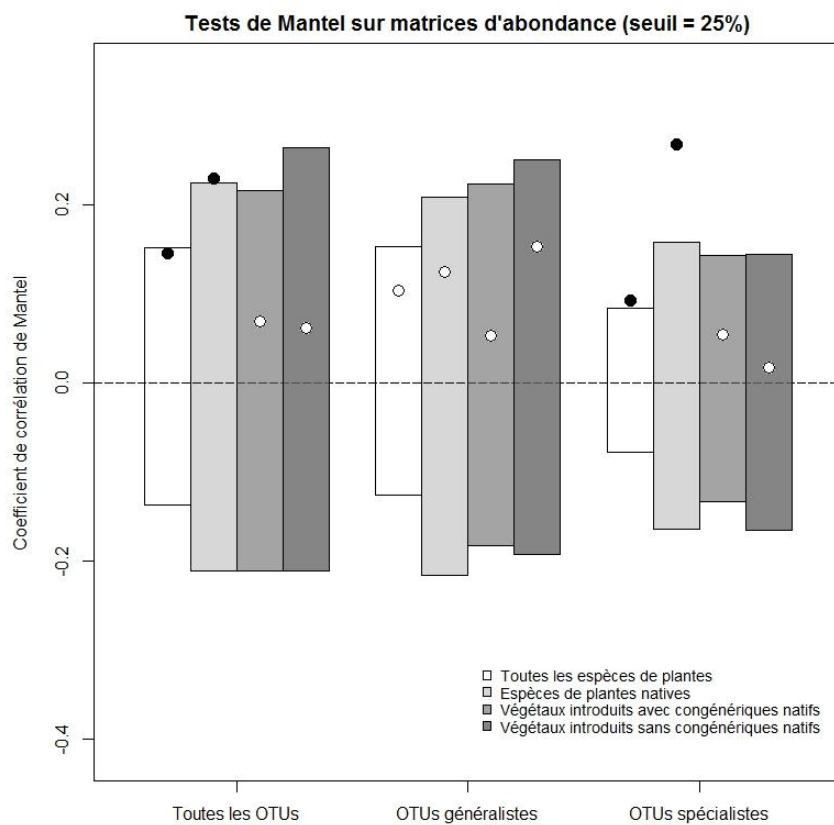
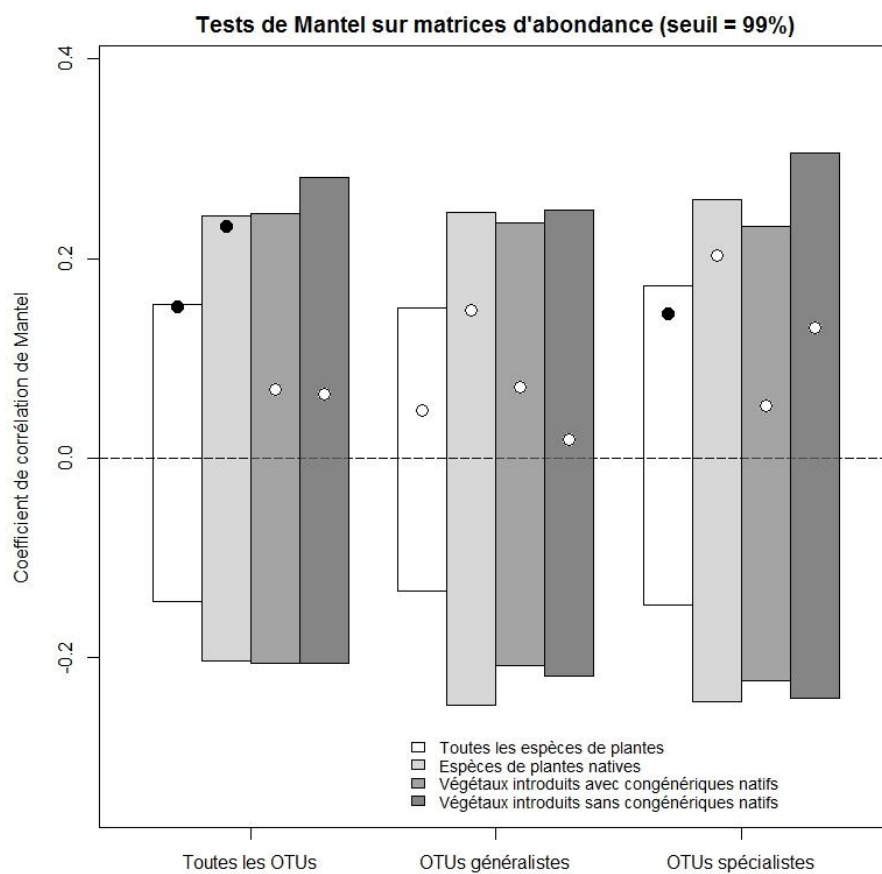


Figure S4 : Corrélations de Mantel entre la distance phylogénétique entre espèces de plantes et leur distance écologique (définie comme la dissimilarité des CFP associées) basée sur les matrices de présence-absence. Les rectangles représentent l'intervalle de confiance à 95% des 1000 coefficients de corrélation obtenus par permutation. Les cercles représentent le coefficient de corrélation observé. Les valeurs de r incluses dans les intervalles de confiance à 95% ne sont pas significativement différentes de zéro (cercles blancs). Les cercles noirs indiquent un signal phylogénétique significatif sur la composition des CFP associées aux espèces de plantes.





Figures S4 bis : Tests de Mantel réalisés à différents seuils de différenciation des OTUs généralistes et spécialistes sur les matrices d'abondances.

Tableau S3 : Résultats des effets du statut et de l'origine d'introduction sur l'indice de diversité de Simpson, sur les indices de composition basés sur la matrice d'abondance et de présence/absence, calculés grâce aux modèles GLS.

OTUS		Variables de réponse	Delta AIC	Likelihood Ratio	P-value
Indice de diversité de Simpson	Toutes	Statut	2.685	1.315	0.518
		Origine	0.021	3.979	0.137
	Généralistes	Statut	1.706	2.294	0.318
		Origine	1.156	5.156	0.076
	Spécialistes	Statut	1.402	2.598	0.273
		Origine	2.852	1.148	0.563
Indice de composition (abondance)	Toutes	Statut	1.863	2.137	0.344
		Origine	0.93	3.07	0.215
	Généralistes	Statut	0.374	3.626	0.163
		Origine	1.808	2.192	0.334
	Spécialistes	Statut	3.732	0.268	0.875
		Origine	2.999	1.001	0.606
Indice de composition (présence-absence)	Toutes	Statut	3.442	0.558	0.756
		Origine	0.63	3.37	0.185
	Généralistes	Statut	1.782	2.218	0.33
		Origine	1.665	2.335	0.311
	Spécialistes	Statut	3.953	0.047	0.977
		Origine	3.084	0.916	0.633

Résumé

L'histoire évolutive ancienne des espèces de plantes (*ie.* leur phylogénie) et leur histoire récente (les évènements d'introduction ayant eu lieu au cours des derniers siècles) façonnent les communautés écologiques associées aux plantes. Nous avons ici évalué l'influence de ces deux facteurs sur les communautés fongiques hébergées par le feuillage des plantes (un habitat microbien connu sous le nom de phyllosphère). Notre hypothèse principale est que le signal phylogénétique sur les traits foliaires des plantes se traduit par un signal phylogénétique sur la structure des communautés fongiques de la phyllosphère (CFP). Pour tester cette hypothèse, nous avons caractérisé les CFP pour 84 espèces de plantes de l'Arboretum des Barres (France). Nos résultats montrent que les espèces de plantes proches sur le plan phylogénétique tendent en effet à posséder des CFP similaires en terme de composition. Ce signal phylogénétique est induit par les espèces fongiques spécialistes et est plus fort pour les espèces de plantes natives que pour les espèces de plantes introduites.

The ancient evolutionary history (i.e. the phylogeny) and the recent history (in particular, the introduction events) of plant species drive their associated communities. In this study we evaluated the impact of both factors on the fungal communities hosted by the aerial and internal parts of plant leaves, known as the phyllosphere. Our main hypothesis was that the phylogenetic signal in the foliar traits of plant species induces a phylogenetic signal in the structure of phyllosphere fungal communities. To test this hypothesis, we characterized the phyllosphere fungal communities of 84 plant species of the *Arboretum des Barres* (France). Our results suggest that phylogenetically related plant species tend to have fungal communities with a similar composition. This phylogenetic signal is caused by specialist fungal species and it is stronger for native plant species than for exotic ones.