



Interactions biotiques et biologie reproductive de la Truffe noire, *Tuber melanosporum* (Vittad.): des truffières spontanées aux plantations

Elisa Taschen

► To cite this version:

Elisa Taschen. Interactions biotiques et biologie reproductive de la Truffe noire, *Tuber melanosporum* (Vittad.): des truffières spontanées aux plantations. Biologie végétale. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2015. Français. NNT: . tel-02801904

HAL Id: tel-02801904

<https://hal.inrae.fr/tel-02801904>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

Préparée au sein de l'école doctorale Systèmes Intégrés
en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences,
Environnement

Et de l'unité de recherche Centre d'Ecologie Fonctionnelle
et Evolutive (UMR 5175)

Spécialité : **Evolution, Ecologie, Ressources, Génétique,
Paléontologie**

Présentée par **Elisa TASCHEN**

Interactions biotiques et biologie reproductive
de la Truffe noire,
Tuber melanosporum (Vittad.):
des truffières spontanées aux plantations.

Soutenue le 30/06/2015 devant le jury composé de

Mme **Monique GARDES**, Professeur, Université Toulouse

Rapporteur

Mme **Martina PETER**, Directeur de recherche,

Rapporteur

Swiss Federal Research Institute WSL, Birmensdorf

M **José-Antonio BONET**, Ingénieur de recherche,

Examineur

Universidad de Lleida, Lleida

M **Doyle McKey**, Professeur, CEFE, CNRS,

Président du Jury

Montpellier

M **Marc-André SELOSSE**, Professeur, MNHN, Paris

Directeur de thèse

M **Franck RICHARD**, Maître de conférence, CEFE

Directeur de thèse

Université Montpellier II

M **Claude MURAT**, Ingénieur de recherche, INRA,

Membre invité

Nancy

M **Xavier Parladé**, Chercheur, IRTA, Cabrils -

Membre invité

Barcelona

Interactions biotiques et biologie reproductive de la
Truffe noire, *Tuber melanosporum* (Vittad.): des
truffières spontanées aux plantations

∞

Biotic interactions and reproductive biology of the
Black Truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.), from
spontaneous to planted truffle grounds

∞

Résumé

La Truffe noire (*Tuber melanosporum* Vittad.) est un champignon ectomycorhizien spontanément présent dans les groupements végétaux ouverts en cours de reforestation. Alors que ces milieux ont fortement régressé au XX^e siècle dans la zone méditerranéenne, 80 % de la production actuelle provient de boisements artificiels où des arbres inoculés par la Truffe sont plantés. Malgré un grand corpus de connaissances empiriques, la production reste souvent aléatoire et les connaissances fondamentales d'écologie et de biologie de la Truffe restent fragmentaires. Dans ce travail, nous avons d'abord étudié la distribution de la diversité fongique ectomycorhizienne sur les différents hôtes présents dans les garrigues pré-forestières à Truffe. Nous avons ensuite testé les interactions entre la Truffe et les plantes endo- ou non-mycorhiziennes, qui se matérialisent par la création d'un brûlé, où la flore est localement affectée. Dans un troisième volet, nous avons cherché à mieux comprendre la diversité génétique des populations de Truffes, et plus spécifiquement l'appariement sexuel et la dispersion de cette espèce à vie végétative haploïde et à fructification hypogée. Par une approche comparative entre truffières plantées et spontanées, nous avons finalement évalué les modifications liées au processus de proto-domestication en cours. Ainsi, en combinant écologie des communautés, expériences en conditions contrôlées et génétique des populations, nous avons montré qu'en région méditerranéenne :

- 1) La Truffe est présente de façon fugace dans des communautés ectomycorhiziennes riches, avec de nombreuses espèces multi-hôtes, mais où la Truffe montre une préférence d'hôte marquée pour le chêne vert (*Q. ilex*).
- 2) Certaines plantes endo- ou non-mycorhiziennes, dont l'effet positif sur la Truffe a empiriquement été observé par les trufficulteurs, favorisent le développement du mycélium de Truffe dans le sol, agissant indirectement sur les interactions plante-plante (chêne – plantes endomycorhiziennes). L'effet inhibiteur de la Truffe observé sur la germination des graines peut-être une des causes précoces du brûlé. Par ailleurs, la Truffe semble effectivement coloniser les racines de plantes herbacées non-ectomycorhiziennes.
- 3) Les flux de gènes sont limités à l'échelle de la truffière ; l'appariement sexuel réunit des individus proches génétiquement et physiquement, et bien que la Truffe soit probablement hermaphrodite, les parents paternels sont peu détectables, probablement de taille plus réduite que les parents maternels (formant la gléba). Les pratiques culturelles pourraient entraîner un brassage génétique plus important en plantation, mais à l'échelle régionale, aucune différence de diversité génétique n'a été détectée entre populations spontanées et cultivées.

Ce travail montre la richesse des interactions biotiques impliquant la Truffe et les diversités végétale et fongique des truffières artificielles et spontanées de la région méditerranéenne. Les résultats acquis contribuent à lever le voile sur sa biologie reproductive, et jalonent le chemin pour des pratiques intégratrices de la diversité biologique des truffières, ainsi que pour le développement de futures expérimentations *in situ*.

Mots clés : appariement sexuel, *Arbutus unedo*, *Cistus albidus*, domestication, écologie des communautés, forêts méditerranéennes, génétique des populations, isolement par la distance, ITS, microsatellites, mésocosmes, mycorhizes, pratiques empiriques, qPCR, *Quercus coccifera*, *Quercus ilex*, successions secondaires

Abstract

The Black Truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) is an ectomycorrhizal fungus spontaneously growing in open woodlands before canopy closure. Such open landscapes drastically regressed during the last century in the Mediterranean regions, and nowadays 80% of the production comes from man-made plantations where the Truffle is inoculated. Despite a large corpus of local knowledge and empirical practices, the production remains largely sporadic and unpredictable, and our knowledge of the biology and ecology of the Truffle is still fragmentary. In this work, we first analyzed the distribution of the ectomycorrhizal fungal diversity among host plants co-existing in the shrub-dominated landscapes where Truffle naturally occurs. We then analyzed the interactions between the Truffle and endo- or non-mycorrhizal plants, as they typically occur in the so-called *brûlés*, zones with scarce vegetation. A third part aimed at better understanding the genetic diversity of Truffle populations, with special focus on fertilization and dispersal process of this fungus with haploid lifecycle and hypogeous fruiting. In a multi-scale approach combining community ecology, experimentation and population genetics, we found that in the Mediterranean region:

- 1) The Truffle is transiently present in rich ectomycorrhizal communities, showing a significant host preference for *Q. ilex*, in assemblies made of numerous multi-host fungal species.
- 2) Some endo- or non-mycorrhizal plants species, that were supposed to provide beneficial effect on the Truffle, can be experimentally shown to stimulate the development of *T. melanosporum* mycelium in soil, and indirectly trigger plant-plant interactions (between oak and endomycorrhizal plants). The early brûlé symptoms could at least partially result from a Truffle's inhibitor effect on seed germination.
- 3) At truffle ground scale, gene flow is limited, and mating occurs between genetically and physically close parents. Despite probable hermaphroditism of the Truffle, paternal parents are poorly detectable, certainly of smaller size than maternal ones (these forming nourishing tissue of the ascocarp). Cultural practices could favor genetic mixing/diversity at brûlé scale, but at the regional scale, no difference in genetic diversity was found between spontaneous and planted compartments.

This work revealed the richness of biotic interactions involving the black Truffle and the plant as well as the fungal diversity in both artificial and spontaneous truffle-ground of the Mediterranean region. These results enlighten the reproductive biology of the species, and pave the way for practices integrating the biological diversity of truffle-grounds and the development of further *in situ* experimentations.

Key words: *Arbutus unedo*, *Cistus albidus*, community ecology, domestication, empirical practices, local knowledge, experimental approach, inbreeding, isolation by distance, ITS, Mediterranean forests, mesocosms, microsatellites, mycorrhiza, population genetics, qPCR, *Quercus ilex*, *Q. coccifera*, secondary successions.

Table des matières

Introduction	15
1 L'association ectomycorhizienne et sa maîtrise par l'homme.....	17
1.1 Découverte de l'association mycorhizienne	17
1.2 Emergence et fonctionnement de l'association mycorhizienne	17
1.3 Applications à la foresterie.....	20
1.4 ...et aux champignons comestibles	20
2 La Truffe et l'homme.....	21
2.1 Les grandes lignes du cycle de vie annuel de la Truffe.....	21
2.2 Exigences pédo-climatiques	23
2.3 Les trufficultures d'hier à aujourd'hui	25
2.4 Etapes clés de la vie d'une truffière	28
3 Ecologie de la Truffe, ... ou avec qui co-existe-t-elle ?	33
3.1 La Truffe dans la communauté ectomycorhizienne	33
3.2 La Truffe et les plantes non-ectomycorhiziennes.....	36
4 Biologie de la Truffe, ... ou comment se reproduit-elle ?	38
4.1 Dynamique des populations : lien à la stratégie écologique des champignons ECMs.....	38
4.2 La reproduction chez les champignons : les mécanismes impliqués	42
4.3 Reproduction de la Truffe : découvertes récentes et points non résolus	45
5 Objectifs, questions et principales étapes de travail	50
Chapitre I Communautés ectomycorhiziennes des brûlés spontanés	53
Résumé en français.....	55
Article 1	59
Introduction.....	61
Results	62
Discussion.....	67
Conclusion	70
Experimental Procedures	70
References	72
Chapitre II Interactions entre la Truffe, son hôte et des plantes non-ectomycorhiziennes.....	83
Résumé en français.....	85
Article 2	89

Introduction.....	91
Materials and methods	97
Results	101
Discussion.....	108
Conclusion.....	114
References.....	115
Chapitre III Eléments de la biologie reproductive de la Truffe.....	125
Résumé en français.....	127
Article 3.....	131
Perspectives	135
References.....	135
Article 4.....	137
Abstract	139
Introduction.....	140
Materials and methods	143
Results	147
Discussion.....	155
Conclusion.....	160
References.....	161
Discussion & perspectives	191
1 Naissance, vie et mort des truffières.....	193
1.1 Naissance du brûlé	193
1.2 Développement végétatif et fructification dans les brûlés producteurs.....	196
1.3 Senescence des truffières	204
2 Récapitulatif des principales perspectives de recherche.....	205
2.1 Un champignon en interaction avec des hôtes variés	205
2.2 Un champignon Ascomycète hypogé.....	207
Conclusion générale	208
Des sources d'inspiration réciproques	208
1. Truffières spontanées et plantées	208
2. Savoirs locaux, science & trufficulture	208
Bibliographie	211

Abréviations

AM : endomycorhizien arbusculaire

CMN: *common mycorrhizal network*

ECM : ectomycorhizien

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

MT : *Mating-type*, type sexuel en français. MAT 1-1 : MT1 ; MAT1-2-1 :MT2

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PCRq : *quantitative Polymerase Chain Reaction*

Com. pers. : communication personnelle

VI : *vegetative incompatibility*

IBD : *isolation by distance*

Liste des encadrés

Encadré 1 : Les types trophiques des champignons.....	19
Encadré 2 : Eléments phylogénétiques du genre <i>Tuber</i>	25
Encadré 3 : L'homme et les écosystèmes méditerranéens.	27
Encadré 4 : La filière de la Truffe.	32
Encadré 5 : Facteurs déterminant l'assemblage des communautés ectomycorhiziennes.....	34
Encadré 6 : Stratégie écologique.....	35
Encadré 7 : Identifier les champignons et leurs hôtes : techniques de biologie moléculaire.	36
Encadré 8 : Génétique des populations ; concepts, outils et glossaire.	40
Encadré 9 : Avantages évolutifs du sexe.....	42
Encadré 10 : Les gènes associés au type sexuel (<i>mating-type</i>).....	49
<u>En Annexe</u>	
Encadré A1 : La notion d'espèce moléculaire.....	230

Liste des figures

Les figures des articles ont leur propre numérotation, seules les figures du corps de texte du manuscrit, en français, sont référencées ici.

Figure 1 : Morphologie des différents types d'associations mycorhiziennes (repris de Selosse & Le Tacon, 1998).....	18
Figure 2 : Schéma illustré du cycle de vie annuel de la Truffe.....	22
Figure 3 : Photo de brûlés (J.-F. Tourrette) où la végétation est visiblement moins dense excluant certaines herbacées, tandis que d'autres espèces semblent moins affectées (notamment <i>Saponaria ocymoides</i> , visible par ses fleurs roses). Des graminées en bordures de brûlés (flèche) rougissent ou jaunissent sous l'action du brûlé au printemps.....	24
Figure 4 : Evolution de la production de Truffe au cours du XX ^e siècle (d'après Hall <i>et al.</i> , 2001), principalement basée sur les chiffres des ventes de truffes effectuées sur les marchés.....	26
Figure 5 : Truffière spontanée (a. chez P. Bernadach, Pyrénées-Orientales) et plantée (b. parcelle expérimentale du Grand St-Jean, Bouches-du-Rhône) et c. schéma des étapes clés en trufficulture...	29
Figure 6 : Cycles de reproduction d'un Basidiomycète (a. <i>Coprinus sp.</i> , non ECM) et d'un Ascomycète (b. <i>Peziza sp.</i> , non ECM). (schémas adaptés de Raven <i>et al.</i> , 2000).....	43
Figure 7 : Schéma synthétique des différents modes de reproduction chez les champignons (a.) et des différents types d'appariements sexuels (b.). (Schémas adaptés de Billiard <i>et al.</i> , 2012).....	44
Figure 8 : Ascocarpe de Truffe (<i>T. melanosporum</i>) ouvert en deux (a.) et broyat d'un échantillon de cet ascocarpe avec présence de fragments de gléba avant isolation des asques (grossissement x 100 ; M. Sauve, b. et spores isolées et éclatées (grossissement x 400 ; A. Guillen, c.).....	46
Figure 9 : Cycle de la Truffe illustrant les différents mécanismes biologiques possibles impliqués dans la reproduction, inspiré d'autres cycles d'Ascomycètes (schéma repris de M.-A. Selosse, non publié).....	48
Figure 10 : Carte des sites d'échantillonnages, avec un focus sur la principale zone d'échantillonnage (Languedoc-Roussillon), précisant le type de truffière (spontanée ou plantée). Les gros points localisent nos principaux sites d'échantillonnages (voir détails dans la légende) et les petits points correspondent aux échantillons de truffes utilisées dans l'analyse de la diversité génétique globale à l'échelle régionale (Article 4).....	52
Figure 11 : Communautés ECMs sur les brûlés au stade producteur, montrant l'abondance relative des OTUs présentes (histogramme, axe de gauche) et le nombre d'espèces hôtes de chaque OTU (points verts, axe de droite). <i>Tuber melanosporum</i> est indiquée en rouge, et les deux autres espèces de <i>Tuber</i> présentes à ce stade en orange.....	57
Figure 12 : Schéma récapitulatif des principales interactions (positives ou négatives) mesurées entre la Truffe (<i>T. mel</i>), son hôte ectomycorhizien (<i>Q. ilex</i>), et six espèces de plantes AM. La médiation indirecte de la Truffe de l'interaction plante ECM - plante AM a été matérialisée par un trait en pointillés. (Biomasse A : aérienne ; R : racinaire).....	87
Figure 13 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l' Article 4	130

Figure 14 : a. Un ascocarpe de *T. melanosporum* trouvé en fin de saison (en mars), dévoré par des larves de mouche, probablement du genre *Suillia*. Les déjections des larves ont été observées sous microscope (**b.** grossissement x 100 ; **c.** grossissement x 400) et montrent les nombreuses spores ingérées, libérées de la gléba (récolte chez J.-L. Magenti ; photos, M. Sauve).195

Figure 15 : Etude de colonisation de fragments racinaires de *Geranium robertianum* de part et d'autre duquel la présence de *T. melanosporum* a été identifiée par des amorces spécifiques et par séquençage de l'ITS (voir **Article 4**). **a.** Observation microscopique d'une coupe transversale semi-fine colorée au bleu Cotton montrant que la racine est colonisée par un champignon (barre : 400 µm). **b.** et **c.** Observation en microscopie électronique à transmission sur coupe ultra-fine où des hyphes actifs et d'autres vides sont visibles (barre: 10 µm) dans des cellules vivantes (voir la membrane entourant les hyphes, fléchée). Noter la paroi à deux assises (une claire et une foncée; cercles) typique d'Ascomycètes et les vésicules multiples (*multilayered bodies*, tête de flèche) qui pourraient être une ornementation de pore intercellulaire de Pézizales (Kimbrough, 1991). Observations réalisées en 2013 avec A. Faccio & P. Bonfante à l'Institut pour la Protection des Plantes (CNR, Turin, Italie).....199

Figure 16 : Image satellite (Google Earth) d'une zone choisie comme exemple en région Languedoc-Roussillon montrant (**a**) une parcelle de truffière plantée et ses rangées d'arbres, (**b**) une zone ouverte caractéristique des truffières spontanées et dont les brûlés sont visibles autours d'arbres ou de groupes d'arbres isolés, et (**c**) de grandes surfaces de forêts fermées, largement dominées par le chêne vert (*Q. ilex*) et dans lesquelles la Truffe ne se développe plus.....202

Figures des encadrés

Figure E1 : Culture du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), sous Paris au début du XX^e siècle (1908).

Figure E3 : Changement d'un paysage au Nord de Montpellier, **a.** en 1929 (carte postale d'époque) puis photographié à la même saison, **b.** durant l'hiver 1992 (Debussche *et al.*, 1999).

Figure E4-1 : Photo d'une visite de truffière organisée par les membres du Centre d'Etudes Techniques et Economiques Forestières (CETEF), afin d'exposer et de discuter des différentes pratiques de cultures mises en œuvre par chacun, ici dans l'Hérault, sur des truffières spontanées (printemps 2013, photo E. Taschen)

Figure E4-2 : Photo du marché très fréquenté de Lalbenque (hiver 2015, photo F. Richard).

Figure E7 : Diversité des ECMs échantillonnées dans une seule carotte de sol (10 cm de diam. ; 15 cm profondeur) sous chêne vert. (photo E. Taschen)

Figure E8 : Processus modelant la structure génétique des populations. Schéma inspiré de Vincenot 2009. * Le flux de gènes peut s'effectuer chez les champignons par fragmentation du mycélium, dispersion des spores (méiotiques), et chez les ascomycètes éventuellement par dispersion des conidies (spores mitotiques) ou spermaties lorsqu'elles font office de gamètes.

Remerciements

Cette thèse est le travail d'une communauté de personnes, d'une grande diversité, avec qui j'ai pris grand plaisir à interagir, que je remercie ici par quelques mots, en pensée bien plus encore !

En premier lieu, je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Marc-André Selosse et Franck Richard, de m'avoir permis de prendre ce chemin. Vous avez été pour moi, d'une très riche complémentarité ! Vous m'avez laissé beaucoup d'espace, guidé par vos inspirations. Marc-André, (Phileas Fogg, *alias* le lapin blanc), d'une efficacité redoutable, d'une pédagogie vitaminée, ta vive lueur m'a aiguisé l'esprit, et je te remercie infiniment de m'avoir embarqué un bout de chemin avec toi ! Merci aussi pour le partage de tes relations et pour ton profond soutien ! Franck, ta « positive-pédagogie » laissera une trace indélébile en moi ! Un immense merci pour tout ce que tu m'as fait partager, tes connaissances, ton embarcadère de projets, et ta capacité à rêver la science ! Merci pour votre formation et je suis très heureuse des liens qui se sont tissés !

J'ai eu un immense plaisir à rencontrer de si chaleureux et passionnés trufficulteurs ! Ma première pensée va à Pierre Bernadach : c'est toi qui m'as initié ! Tu as su me montrer la complexité des truffières spontanées, sur lesquelles j'ai passé de très riches moments, autour de la truffe, de la garrigue et amicalement ! Ensuite, Gaby Callot, sacrée tornade dans mes connaissances académiques bien rangées, tu m'as entraîné un peu plus encore dans le monde captivant de la trufficulture, scientifiquement et humainement, et rappelé combien il est important de remettre incessamment les choses en question ! Annie Guillen, vous m'avez « ouvert les yeux » par vos observations microscopiques, d'une impressionnante méticulosité ! Merci à Jean-François Tourrette pour ta participation enthousiaste, Jean-Paul Laurents, Paul Stengel, Jean-Pierre Braye, Christophe Bot, Hervé Covès, pour votre accueil chaleureux, souvent autour de votre table, les échanges enrichissants et votre généreuse participation à ce projet, qui a pu se réaliser grâce à vous tous ! Merci aussi à Michel Tournayre et Bernard Assenat pour votre appui. Je me réjouis aussi de la richesse des rencontres effectuées grâce au projet Micosylva, notamment Xavier Parladé, avec qui l'interaction fut très porteuse ! Et tant d'autres encore, que je ne peux tous lister ici !

Un grand merci à François Rousset, pour ta précieuse aide en génétique des populations, tes conseils et nombreuses explications qui m'ont donné du grain à moudre pour longtemps encore (*Work in progress*). Merci beaucoup à Daniel Mousain, pour la transmission de nombreuses archives de recherches, d'une époque où le PDF n'existait pas encore. Et surtout, Daniel, je te suis très reconnaissante pour ton aide lors de la finalisation de ce manuscrit ; merci pour tes méticuleuses corrections.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont rendu ces trois années au CEFÉ si riches et intéressantes, les anecdotes de Doyle, tu m'as entre-ouvert les portes des amphithéâtres de l'université, Alain Renaux et tes histoires en herbe, Ameline-the-Ameline, et l'équipe entière des Interactions biotiques du CEFÉ. Durant ces trois années j'ai surtout été plongée au service des marqueurs moléculaires, merci à Véronique pour ta gentillesse et Marie-Pierre, phare dans la tempête, merci pour ton soutien et tes conseils. Merci au super-terrain expérimental du CEFÉ, Thierry et particulièrement David, toujours souriant et avec toutes les solutions en poche ! Merci aux stagiaires avec qui j'ai eu la chance de travailler, Camille, Benjamin, pour votre enthousiaste participation, et Bryan, pour ta grande méticulosité, tu m'as beaucoup aidé ! Et je remercie Raphaëlle de vous avoir coaché à la PACE.

Jean-Michel, ton admirable « triangleritude » m'inspirera encore longtemps, je te remercie de m'avoir fait partager un bout de ta passion pour la mycologie, et de m'avoir littéralement nourrie -rares sont

les personnes qui savent respecter le quatre-heures ! Adrien, grand maitre R, geek-affaires et contestations en tout genre, je te remercie pour ce très précieux bagage ! Et dans le même bateau durant ces trois années, Hélène, je te remercie ton aide, ta bonne humeur et si grande gentillesse ! Alex-le-grand, avec toi il fait bon rire ! Même pas besoin de mouches pour trouver des truffes ! Merci pour ton oreille attentive ! Mathieu, toi, Ô mon binôme irremplaçable ! Efficace, téméraire, et fichtrement positif, tu m'as épaulé tout au long de cette thèse, que tu as sacrément égayée, merci, merci, merci, et merci encore ! Vient ensuite ma rayonnante Laure ! Milles mercis, tu m'as tellement aidée, rien n'est jamais ennuyeux avec toi ! Et merci encore pour ton intense participation à la rédaction de ce manuscrit ! Mais avant tout, d'être tellement libre ! Siempre Libertad !

J'espère que je n'oublie pas trop de monde... ! Et je pense aussi à ceux qui sont là depuis plus longtemps, un immense merci, *Tausend Dank*, à vous, ma très chère famille, papa- ton apaisement et positivisme en toute circonstance, mama- ton soutien et ton émerveillement sur le monde, et merveilleuse Martha, -ma deuxième moitié ! Vous m'avez toujours soutenue et portée haut de votre confiance et de vos vifs encouragements ! Ainsi que vous, mes ami(e)s & belle-famille, pour votre patience, oreilles-attentives, conseils, et +++ , Sophie, quelle chance de t'avoir -merci d'être toujours là, ma croustillante Elise, Alix, Ségo-là-haut, Carole, Laulau et joyeux *eccetera*.

Un incommensurable merci à toi, Mika, d'avoir toujours été à mes côtés, ma recharge vitale ! Merci pour ta longue patience, tes encouragements et soins attentionnés ! Tu m'as tellement motivée par ta grande curiosité et inspiré de ton zèle et féroce obstination !

Enfin, pour reprendre la citation d'un célèbre aventurier, la thèse « C'est une épreuve, mais c'est aussi une belle aventure. »

Préambule

J'ai effectué ma thèse au Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive de Montpellier, sous la direction de Marc-André Selosse (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) et Franck Richard (Université de Montpellier II). Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet ANR SYSTRUF (Ecosystèmes, Territoires, Ressources vivantes et Agricultures), cofinancé par la Région Languedoc-Roussillon. Une demi-bourse de thèse m'a été accordée par la Fondation de France dans le cadre d'un programme de soutien aux jeunes chercheurs en agroforesterie. Enfin, ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans la participation active et bénévole de très nombreux trufficulteurs.

Nota bene

Employé sans autre qualificatif, le terme « truffe » évoque pour les Français un champignon bien déterminé, hautement apprécié des gastronomes, la Truffe noire, *Tuber melanosporum*. Ainsi, pour alléger le discours de ce manuscrit, le terme « Truffe » avec majuscule se référera à cette espèce, à opposer à la forme sans majuscule, se référant au genre ou à la fructification.

Alors que la Truffe est traditionnellement collectée dans des boisements jeunes et ouverts, sa production actuelle provient majoritairement de plantations. Cependant, la production reste aléatoire et peu maîtrisée, et la connaissance de la biologie de cette espèce, malgré la résurgence de travaux qui lui ont été consacrés, reste fragmentaire. Ce travail vise à mieux comprendre des éléments de l'écologie et de la biologie de la Truffe, et plus précisément :

- la dynamique dans le temps des communautés fongiques ectomycorhiziennes dans lesquelles elle s'installe de manière spontanée ainsi que la place qu'elle occupe au sein de celles-ci,
- la nature de ses interactions avec les plantes des communautés végétales communément présentes dans les truffières,
- son régime de reproduction et la structure génétique des populations en truffières spontanées et plantées.

Ces aspects ont été abordés à l'aide d'outils de biologie moléculaire, de biologie des populations et des communautés, et d'écologie expérimentale. Dans la première partie de ce manuscrit, j'introduirai le sujet et définirai les concepts et questions abordés. Ensuite, les trois thématiques précédentes feront chacune l'objet d'un chapitre, introduit par un court résumé en français suivi d'un article en anglais, destiné à être publié dans une revue scientifique. Enfin, les principales conclusions seront reprises dans une discussion finale et intégrées dans le corpus d'une réflexion générale.

Liste des articles

Article 1: « *Whose truffle is this? Distribution patterns of ECM fungal diversity in Tuber melanosporum brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities.* »

Accepté dans *Environmental Microbiology*, Août 2014.

Article 2: « *Tri-partite interactions between the black truffle (Tuber melanosporum), the holm oak (Quercus ilex) and truffle grounds plants in mesocosm.* »

Première version de l'article, qui sera à compléter après obtention des dernières mesures à effectuer à la fin du printemps 2015.

Article 3: « *Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility?* ». Commentaire publié dans le *New Phytologist*, 199(1), 10-13. Juillet, 2013.

Article 4: « *Mediterranean Tuber melanosporum populations revealed high inbreeding and strong isolation by distance, with limited impact of on-going domestication.* »

Article en préparation.

Introduction

1 L'association ectomycorhizienne et sa maîtrise par l'homme

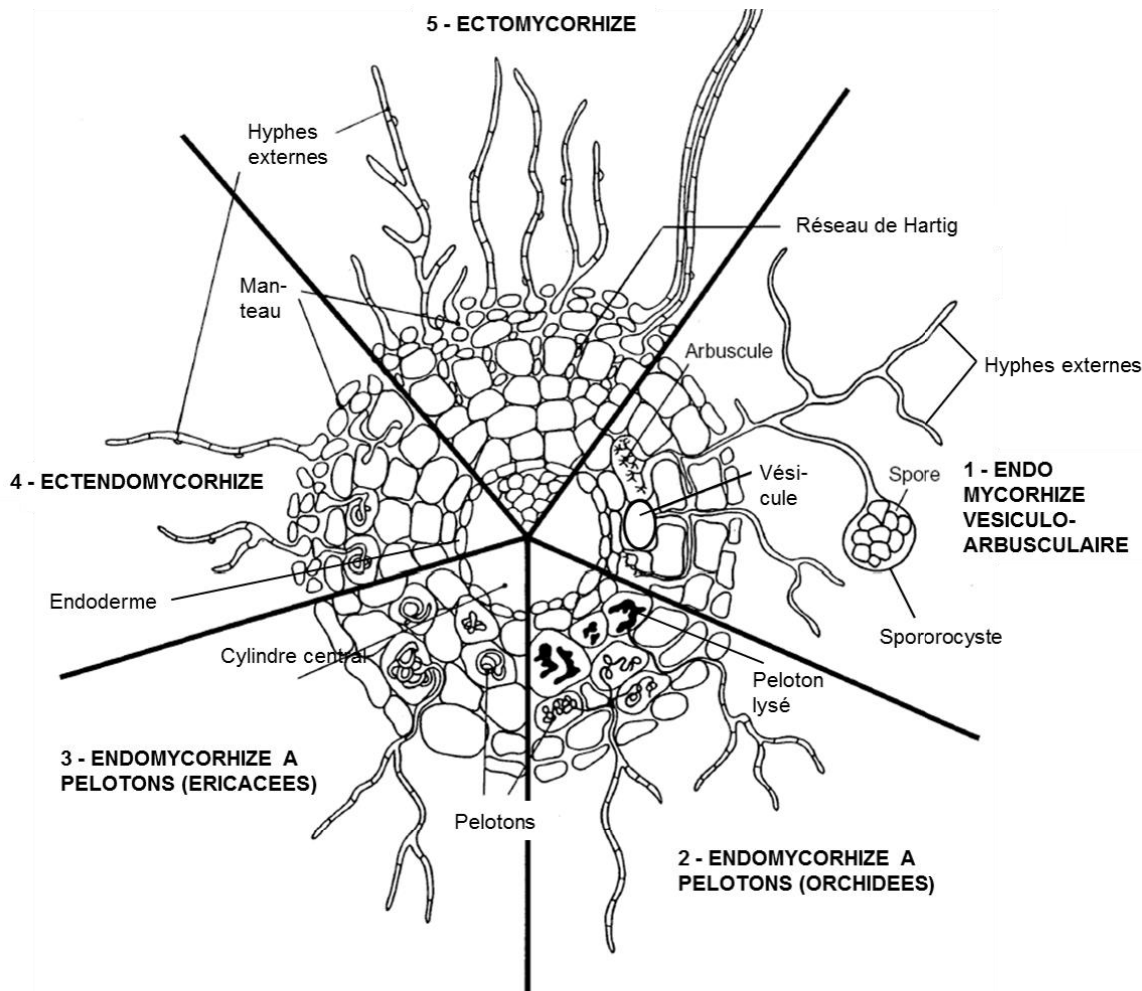
1.1 Découverte de l'association mycorhizienne

Organismes hétérotrophes, les champignons se procurent de la matière organique par trois modes trophiques majeurs (mutualisme, parasitisme et saprophytisme) [Encadré 1]. Alors que de nombreuses espèces de champignons saprotrophes sont cultivées avec succès (Oei, 2003) depuis longtemps, telle l'oreille de Judas (*Auricularia auricula*) cultivée en Chine depuis 600 av. J.-C. (Hall & Zambonelli, 2012) ou encore le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) dont la culture remonte au XVII^e siècle [Encadré 1], d'autres espèces de champignons donnent plus de peine. Souhaitant initier la culture de certaines espèces de truffes, le ministre de l'agriculture du royaume de Prusse mandata, à la fin du XIX^e siècle, le biologiste forestier A.B. Frank pour une étude sur ce sujet. Il fut alors le premier à comprendre la nature symbiotique de l'association chimérique entre racines et champignons, pourtant décrite longtemps auparavant, à laquelle il attribue le nom de mycorhize [du grec *mukè*, champignon, et *rhizon*, racine ; (Frank, 2004), traduction anglaise de l'article original de 1885]. Dans le cadre de cette symbiose, la plante fournit au champignon du carbone, qui en retour assure sa nutrition hydro-minérale [Encadré 1]. De plus, les deux partenaires se protègent réciproquement des agressions du sol. Ainsi, chez les espèces mycorhiziennes, la culture du champignon seule est difficile, voire parfois impossible, et se limite au stade végétatif si l'ensemble de l'association arbre-champignon n'est pas appréhendé.

1.2 Emergence et fonctionnement de l'association mycorhizienne

Le champignon colonise la surface et le cortex. A l'extérieur, les fins hyphes fongiques explorent efficacement le sol (Fig. 1). De cette symbiose dépendent 90% des végétaux (Brundrett, 2002 ; van der Heijden *et al.*, 2015) et il existe différents types d'associations mycorhiziennes, se distinguant par leurs structures anatomiques, les taxons fongiques et les familles de plantes impliquées (Fig. 1). Des traces fossiles et des analyses phylogénétiques datent l'apparition des associations mycorhiziennes à l'Ordovicien où elles auraient joué un rôle majeur dans la colonisation des terres émergées par les végétaux (Remy *et al.*, 1994 ; LeTacon & Selosse, 1994). En effet, les structures fossiles trouvées ressemblent très fortement aux structures des endomycorhizes arbusculaires (AM) que forment aujourd'hui les Gloméromycètes avec environ 80 % des plantes (Smith & Read, 2008) avec seulement 244 espèces connues. Plus récemment, il y a 100-200 Ma, l'association ectomycorhizienne a émergé (van der Heijden *et al.*, 2015). Apparue indépendamment plusieurs fois au cours de l'évolution, et impliquant des espèces fongiques dérivées de champignons saprophytes Asco- et Basidiomycètes (Brundrett, 2002), cette symbiose est aujourd'hui formée par un grand nombre d'espèces de champignons, de l'ordre de 20 000 espèces (Rinaldi *et al.*, 2008; Tedersoo *et al.*, 2012), dont seules 5 000 sont actuellement connues (Smith & Read, 2008). Cette association concerne pour l'essentiel des plantes ligneuses appartenant à un nombre limité de familles (Pinacées, Fagacées, Tiliacées, Cistacées, *etc.* ; Brundrett, 2002) mais qui dominent les forêts boréales, tempérées et méditerranéennes (Smith & Read, 2008). Les ectendomycorhizes de certaines Ericacées basales en régions tempérées sont aussi formées par des Asco- et des Basidiomycètes. Elles ne se distinguent des ectomycorhizes que par la pénétration des cellules du cortex intérieur, leur aspect extérieur étant similaire à ces dernières (formation d'un manteau ; Fig. 1), alors que les endomycorhizes des orchidées et des éricacées restent invisibles de l'extérieur (Fig. 1).

Figure 1. Morphologie des différents types d'associations mycorhiziennes (repris de Selosse & Le Tacon, 1998).



Malgré la perte de nombreux gènes liés à la dégradation de la lignine et de la cellulose (Plett & Martin, 2011), les champignons ectomycorhiziens (ECMs) possèdent d'importantes capacités catalytiques permettant d'exploiter les ressources organiques (Rineau *et al.*, 2012) et minérales du sol [Encadré 1], allant jusqu'à la dissolution de certains minéraux (Landeweert *et al.*, 2001). Alors que le caractère bénéfique de la symbiose mycorhizienne a longtemps été mis en avant, il apparaît néanmoins qu'en fonction des conditions biotiques et abiotiques de l'environnement cette interaction n'est pas toujours bénéfique et réciproque (Johnson *et al.*, 1997) et une méta-analyse a montré que dans 20-25% des études (plus de 600) la réponse de la plante à la mycorhization est négative.

Encadré 1 : Les types trophiques des champignons

○ Les mutualistes

... acquièrent leur carbone grâce à l'interaction mutuellement bénéfique (symbiotique) avec un autre organisme. Ainsi, les champignons mycorhiziens acquièrent leur carbone grâce à leur plante hôte, qui reçoit en retour de l'eau et des sels minéraux du champignon.

○ Les saprotrophes

... acquièrent leur carbone à partir de matière organique morte. Les substrats diffèrent selon les espèces, des moisissures de fromages (*Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* produisant protéases, lipases et « beta-ketoacid decarboxylases ») aux champignons lignicoles (qui sont les seuls organismes capables de dégrader la lignine du bois) essentiels à la décomposition et au recyclage de nos forêts grâce à leurs ligninases et cellulases.

Figure E1. Culture du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), sous Paris au début du XX^e siècle (1908).



○ Les parasites

... vivent aux dépens d'autres organismes. Le parasitisme nécrotrophe peut mener à la mort de l'hôte, et le champignon continue alors éventuellement de vivre en saprotrophe, telle l'Armillaire couleur de miel (*Armillaria mellea*).

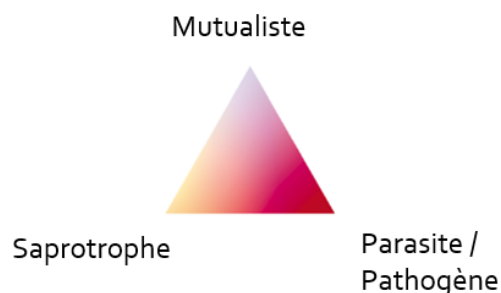
Une réalité plus complexe

Il apparaît de plus en plus que les barrières entre ces trois types trophiques sont en réalité perméables. L'abondance naturelle des isotopes stables de ^{15}N et ^{13}C est utilisée pour identifier les sources des nutriments exploitées par l'espèce de champignon (au niveau des ectomycorhizes ou des carpophores). L'enrichissement en ^{15}N et ^{13}C signe la provenance d'une source organique, permettant ainsi de différencier saprotrophes et ectomycorhiziens (Hobbi *et al.*, 2001). Cependant, la distinction reste parfois difficile, à cause de signatures intermédiaires. En effet, les espèces ECMs peuvent exploiter différentes sources de N, minérale ou organique, et leur dépendance au carbone de l'arbre pourrait même être variable. Il apparaît par exemple que la signature ^{13}C de l'espèce ECM *Inocybe fastigiata* est proche de celle de saprotrophes, laissant supposer que sa source prépondérante provient, dans cette étude au moins, plutôt de matière organique morte que de son arbre hôte (Zeller *et al.*, 2008). De plus, Courty *et al.* (2005) ont montré que de nombreuses espèces ECMs exprimaient une forte activité enzymatique de cellobiohydrolase, β -glucosidase, chitinase, laccase, glucuronidase and xylosidase, suggérant la dégradation de polymères du sol comme source de carbone et d'autres nutriments. Alors qu'une grande partie des champignons ECMs ne sont pas cultivables en boîte de Pétri, certaines espèces peuvent être cultivées sans leur hôte. La Truffe, par exemple, est capable de se développer en culture pure en utilisant la cellulose comme source de carbone (Mamoun & Olivier, 1991). De plus, mutualiste de par ses interactions avec son hôte ECMs, il est possible qu'elle interagisse en parasite avec les espèces herbacées (Plattner & Hall, 1995). D'autres espèces fongiques changent de type trophique au cours de leur vie (telle l'Armillaire citée plus haut). Enfin, les modes de vie de certains champignons ne permettent pas de les classer dans l'un des 3 types trophiques cités ci-dessus. Par exemple, les endophytes de type « *Dark Septate Fungi* », non mycorhiziens ont des effets variables sur les plantes qu'ils colonisent, généralement négatifs ou neutres ; ils déterminent également dans de nombreux cas des interactions mutualistes (Jumpponen, 2001).

http://troglos.free.fr/dossiers_val_de_loire/dossier_vdl_c_arriere_champi/chapitre_1/dossier.html

suite Encadré 1 : Les types trophiques des champignons

De même, l'association mycorhizienne ne peut être considérée comme systématiquement mutualiste. Les interactions entre plantes et champignons ECMs sont variables, pouvant aller jusqu'au parasitisme lorsque le coût brut de l'interaction excède celui du bénéfice pour la plante (Johnson *et al.*, 1997 ; Hoeksema *et al.*, 2010). Il faut considérer un continuum entre mutualiste et parasite, et plus généralement entre les types trophiques chez les champignons.



1.3 Applications à la foresterie

Outre son rôle essentiel dans la nutrition des partenaires, l'association mycorhizienne confère une protection contre de nombreuses agressions biotiques et abiotiques (Smith & Read, 2008 ; Pozo *et al.*, 2010) et permet la colonisation de milieux autrement peu viables pour certaines espèces de plantes, tels des sols très calcaires (Smith & Read, 2008) ou contaminés par des métaux lourds (Brunner & Frey, 2000). En foresterie, des arbres sont inoculés avec des souches sélectionnées (Selosse *et al.*, 1998) afin d'améliorer le taux de réussite lors de la plantation, augmenter la croissance dans le jeune âge, et ainsi limiter les opérations coûteuses de dégagement des semis (Kropp & Langlois, 1990 ; Garbaye & Fortin, 2013), et plus récemment à des fins de phytoremédiation (Khan *et al.*, 2000). L'implantation des pins hors de leur zone d'origine tempérée ne fut efficace qu'après un apport empirique de sol provenant de sa zone d'origine (Mikola, 1970 ; Pringle *et al.*, 2009), alors que les méthodes d'inoculations ciblées n'avaient pas encore été mises au point. En pépinière forestière, les premiers essais de mycorhization contrôlée ont été réalisés aux alentours de 1920, en Australie, par inoculation de semis de *Pinus radiata* à l'aide de carpophores de *Rhizopogon luteolus* (Le Tacon, *et al.*, 1997), puis à plus grande échelle à partir de 1982 (Marx *et al.*, 1982).

1.4 ...et aux champignons comestibles

Il existe parmi les champignons ECMs de nombreuses espèces comestibles à haute valeur ajoutée (Zambonelli & Bonito, 2012 ; Hall *et al.*, 2003), tels que le Cèpe de Bordeaux (*Boletus edulis*), la chanterelle (*Cantharellus cibarius*), l'amanite des Césars (*Amanita caesarea*), le matsutake en Asie (*Tricholoma matsutake*), parmi les Basidiomycètes ainsi que des Ascomycètes, dont les morilles (*Morchella* spp.) et les truffes (*Tuber* spp.). L'équipe italienne de Palenzona a été la première, en 1969, à inoculer des plants par des truffes (*T. melanosporum*, *T. aestivum* et *T. brumale*), suivie par G. Chevalier et J. Grente (INRA) en 1972 ; les premiers plants inoculés ont été mis sur le marché par AGRITRUFFE en 1973, alors que de nombreux trufficulteurs développaient des pratiques empiriques similaires. En parallèle, des chercheurs de l'INRA ont étendu ce procédé à d'autres espèces, récompensés par de premières récoltes sur de jeunes parcelles comportant des arbres inoculés par du

bolet commun (*Suillus granulatus*) et ou du lactaire délicieux (*Lactarius deliciosus* ; Poitou *et al.*, 1984). Aujourd'hui, certaines de ces espèces sont introduites avec succès hors de leur aire native de distribution, comme le lactaire délicieux en Nouvelle-Zélande (Wang *et al.*, 2012) où il produit rapidement après plantation, jusqu'à 300 kg/ha (Guerin-Laguette *et al.*, 2014). Néanmoins, la mise en place de plantations ne réussit pas toujours avec autant de succès, certaines espèces de champignons étant plus difficiles à inoculer efficacement (e.g. *T. magnatum*) et durablement, car la perte de l'inoculum après transplantation est fréquente : la maîtrise de cette étape est cruciale (Selosse *et al.*, 1998). Le matsutake en est un exemple, car les plants inoculés perdent très rapidement leur partenaire mycorhizien après transplantation sur le terrain (Yamada *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2005). Ainsi, la production de matsutake repose actuellement uniquement sur la gestion des shiros (microsites de production des matsutake) apparus spontanément dans la forêt, par de nombreuses techniques empiriques visant notamment à réguler les épaisseurs de litière, l'ouverture du milieu et l'irrigation (Wang *et al.*, 2014). De manière plus générale, les gestionnaires commencent à élaborer des plans de gestion forestière prévoyant la production de champignons (Martínez-Peña *et al.*, 2012), et tentant de concilier production ligneuse et fongique (Aldea *et al.*, 2012). En Catalogne, notamment, jusqu'à 7 900 tonnes de champignons comestibles sont commercialisés par an (majoritairement issus de cueillette, hormis les truffes), et représentent un potentiel économique intéressant pour le développement des zones rurales (Bonet *et al.*, 2014).

Ainsi, la production de champignons ectomycorhiziens comestibles est basée sur deux approches principales :

- 1) la gestion des écosystèmes où leur production est spontanée, et
- 2) la mise en place de plantations avec des plants inoculés.

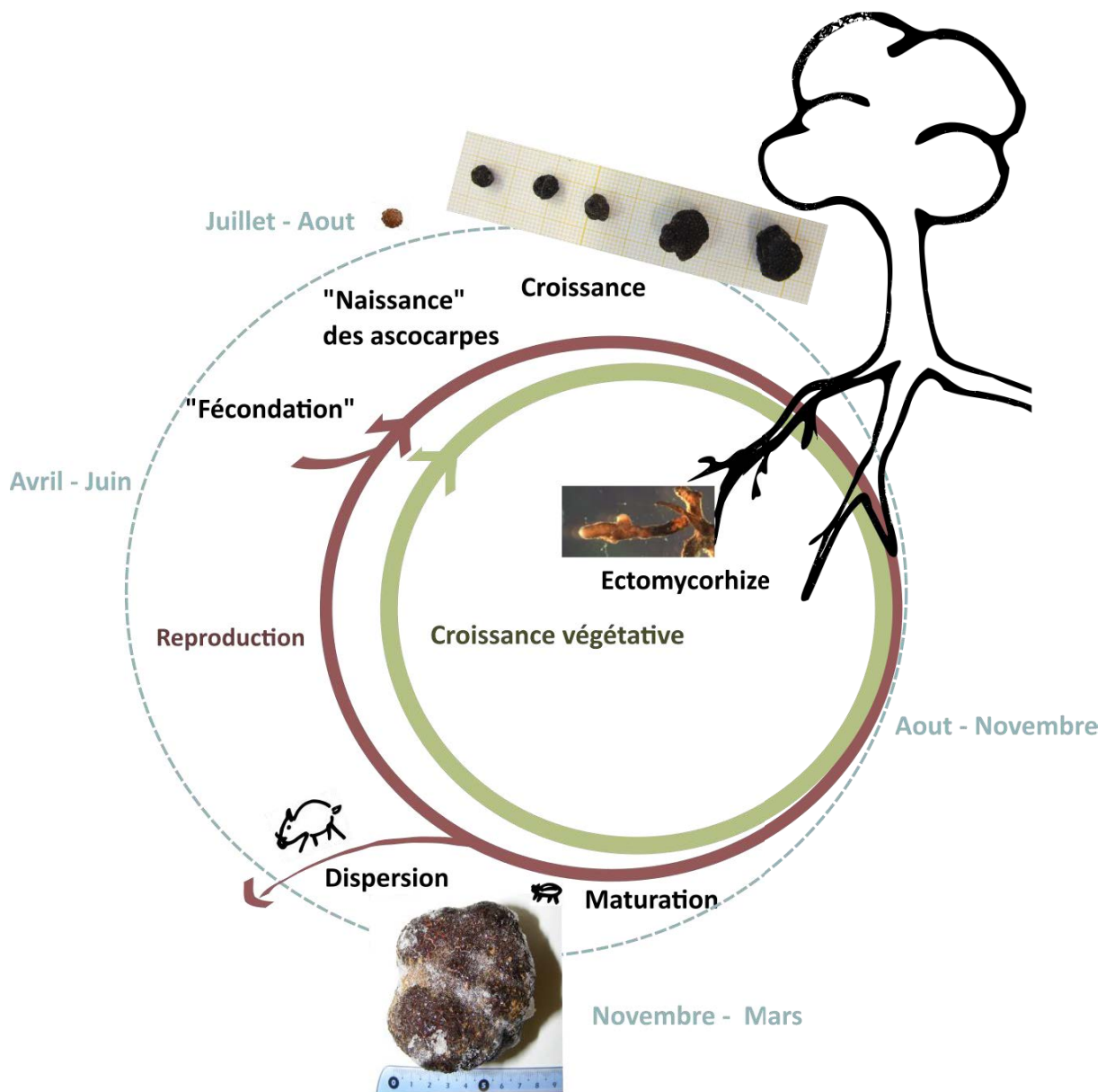
Il en est ainsi de la Truffe, qui à l'heure actuelle, est produite dans ces deux types d'écosystèmes. Dans le premier, les successions secondaires de reconquête forestière impliquent le développement de truffières sauvages, dont certaines sont ensuite entretenues par l'homme (nous parlerons de truffières « spontanées »). Dans le second, d'anciens terrains agricoles sont mobilisés pour introduire l'hôte ligneux et le champignon (nous appellerons ces truffières « cultivées »). Cependant, dans les deux cas, la production reste souvent aléatoire, dépendante de nombreux facteurs biotiques (interactions entre organismes) et abiotiques (le sol, la météorologie, *etc.*) encore mal appréhendés, et les mécanismes sous-jacents des pratiques empiriques, souvent inconnus.

2 La Truffe et l'homme

2.1 Les grandes lignes du cycle de vie annuel de la Truffe

La Truffe, *Tuber melanosporum* [Encadré 2], est un champignon qui fructifie dans les boisements ouverts, son mycélium se développant dans le sol et formant des ectomycorhizes avec plusieurs essences végétales (phase végétative ; Fig. 2). Ses hôtes les plus connus (notamment utilisés pour l'inoculation) sont des espèces de chênes (*Quercus* spp., Fagaceae) et de noisetiers

Figure 2. Schéma illustré du cycle de vie annuel de la Truffe.



(*Corylus* spp., Betulaceae ; Olivier *et al.*, 2012), mais la présence de Truffe et/ou d'autres espèces de *Tuber* a aussi été relevée sur des hôtes moins connus tels que des cistes (Comandini *et al.*, 2006), des hélianthèmes (Richard *et al.*, non publié) ou encore des arbousiers (Lancellotti *et al.*, 2014). La présence de mycélium de Truffe dans le sol est généralement marquée par une zone pauvre en végétation, appelée le **brûlé** (**Fig. 3** ; Streiblová *et al.*, 2012) dont le déterminisme reste encore inconnu (Introduction § 3.2. b, **Chapitre II**). Cette zone est plus ou moins marquée en fonction des sites, mais aussi de la saison : elle est surtout visible au printemps (**Fig. 2**). Sur certains sites les brûlés ne sont que très peu, voire pas du tout visibles, mais cette dénomination désigne tout de même la zone dans laquelle les truffes fructifient. Lorsque ces brûlés sont productifs, la formation des ascocarpes (fructification des Ascomycètes : organe abritant les spores méiotiques) de la Truffe est initiée au printemps, mais cette période dite « de naissance » pourrait se poursuivre jusqu'à fin juillet (Kulifaj, 1984). Durant plusieurs mois, l'ascocarpe se développe dans le sol, grossit et développe son arôme particulier (dû à des composés sulfurés tel que le diméthyl-sulfure et des alcools tels que le 2-méthyl-1-propanol et le 1-octen-3-ol (Splivallo *et al.*, 2011) ; il arrive à maturité sporale et aromatique à partir du mois de novembre et jusqu'aux premiers gels du sol (**Fig. 2**). « Par l'odeur alléchée... », la faune (sangliers, rongeurs, *etc.* ; Talou *et al.*, 1990; Maser *et al.*, 1978) et la macro- et microfaune du sol dispersent ensuite les spores ingérées, dont la paroi épaisse les protège de la digestion (Piattoni *et al.*, 2014). La recherche des truffes repose sur les capacités olfactives de différents animaux. Communément, des chiens et autrefois des porcs étaient dressés à cet effet. La recherche à la mouche, du genre *Suillia* (*S. gigantea* et *S. fuscicornis* étant les plus communes), nécessite une plus grande patience. Ces mouches se posent au-dessus des fructifications afin de pondre dans celles-ci, les larves se développant dans l'ascocarpe mature (Coutin, 1989). Des coléoptères, dont le *Liodes cinnamomea* est le plus connu, repèrent les ascocarpes grâce à leur odeur et attaquent à différents stades de maturité (Hochberg *et al.*, 2003), pouvant induire de véritables dégâts sur la production (Callot, 1999).

2.2 Exigences pédo-climatiques

La Truffe se développe dans des conditions d'éclairement au sol intermédiaires, généralement réunies dans les forêts à faible recouvrement ligneux, les lisières et les milieux pâturés. Même s'il existe de nombreuses exceptions (conditions spécifiques, telles que des sols acides où un apport de carbonate peut suffire), les sols propices à la Truffe sont généralement drainants et calcaires, à tendance alcaline (Jaillard *et al.*, 2014), avec des teneurs en matières organiques réduites et une importante activité biologique (microfaune; Callot, 1999). Son aire géographique d'origine est restreinte aux pays du Nord du pourtour de la Méditerranée. Ce champignon était initialement endémique d'une zone à climat méditerranéen à tempéré, comprenant principalement l'Espagne, la France et l'Italie, mais aussi la Slovénie et la Croatie. Une analyse phylogéographique suggère que les populations de Truffe noire ont recolonisé la France depuis des refuges glaciaires du Nord de l'Italie et de l'Espagne, suivant la migration connue des chênes et suggérant que la Truffe a accompagné ses hôtes ligneux lors de la recolonisation post-glaciaire (Bertault *et al.*, 1998 ; Murat *et al.*, 2004).

Figure 3. Photo de brûlés (J.-F. Tourrette) où la végétation est visiblement moins dense excluant certaines herbacées, tandis que d'autres espèces semblent moins affectées (notamment *Saponaria ocymoides*, visible par ses fleurs roses). Des graminées en bordures de brûlé (flèche) rougissent ou jaunissent sous l'action du brûlé au printemps.



Avec les changements climatiques attendus d'ici la fin du XXI^e siècle, prévoyant une hausse des températures et une baisse des précipitations en région méditerranéenne, la zone de distribution de la Truffe pourrait s'étendre vers Nord, où le climat se réchauffe (Büntgen *et al.*, 2012). En effet, la pluviométrie est un paramètre crucial pour le développement des ascocarpes de Truffe, comme les savoirs locaux semblent l'attester «Sécheresse... disette de truffes» (rapporté par Pagnol, 1983 ; Callot, 1999), et la quantité de truffes noires annuellement mise sur le marché semble corrélée positivement au cumul hydrique entre mai et août (Tacon *et al.*, 2014 ; Büntgen *et al.*, 2015), mais aussi à la température moyenne entre février et avril, (Büntgen *et al.*, 2015).

Encadré 2 : Eléments de phylogénie du genre *Tuber*

Le genre *Tuber*

Les truffes ont longtemps été considérées comme des organismes produits par l'action conjuguée de la foudre, des pluies et de la chaleur (de Théophraste, III^e siècle av. J.-C à Plutarque, 45-125), et n'ont été reconnues comme appartenant aux « végétaux inférieurs » qu'à la Renaissance, par l'Italien Cesalpino (1583). En l'an 70, Pline en distinguait deux espèces (*Tuber alba* et *Tuber nigra* ; Bataille 1922). Outre des découvertes importantes comme le rôle des spores dans la reproduction des truffes, le biologiste Carlo Vittadini (1800-1860) a fait accomplir un bond décisif à la **taxonomie** et la **systématique** des hypogés en général et des *Tuber* en particulier (Riousset *et al.*, 2001), en distinguant les Hymenogasteraceae des Tuberaceae et en redéfinissant de nouvelles espèces, dont *Tuber melanosporum* décrite dans son ouvrage *Monographia Tuberacearum* (1831).

La taxonomie actuelle classe le genre *Tuber* dans la famille des Tuberaceae, au sein de l'ordre des Pezizales. Le genre *Tuber* a été divisé en 5 clades (Jeandroz *et al.*, 2008), avec des espèces d'habitats très divers, des forêts scandinaves (Weden *et al.* 2004 ; Otsing & Tedersoo 2014) aux forêts méditerranéennes jusqu'en Afrique du Nord (Ceruti *et al.* 2003), et sur une large gamme d'hôtes **gymnospermes** et **angiospermes** (Bonito *et al.*, 2010).

Actuellement, 180 espèces au minimum ont été identifiées dans le genre *Tuber* (Bonito *et al.*, 2010) et de multiples découvertes, récemment en Asie (Kinoshita *et al.*, 2011) et en Amérique du Nord (Guevara *et al.*, 2013), font continuellement croître ce nombre.

Origine des Tuberaceae

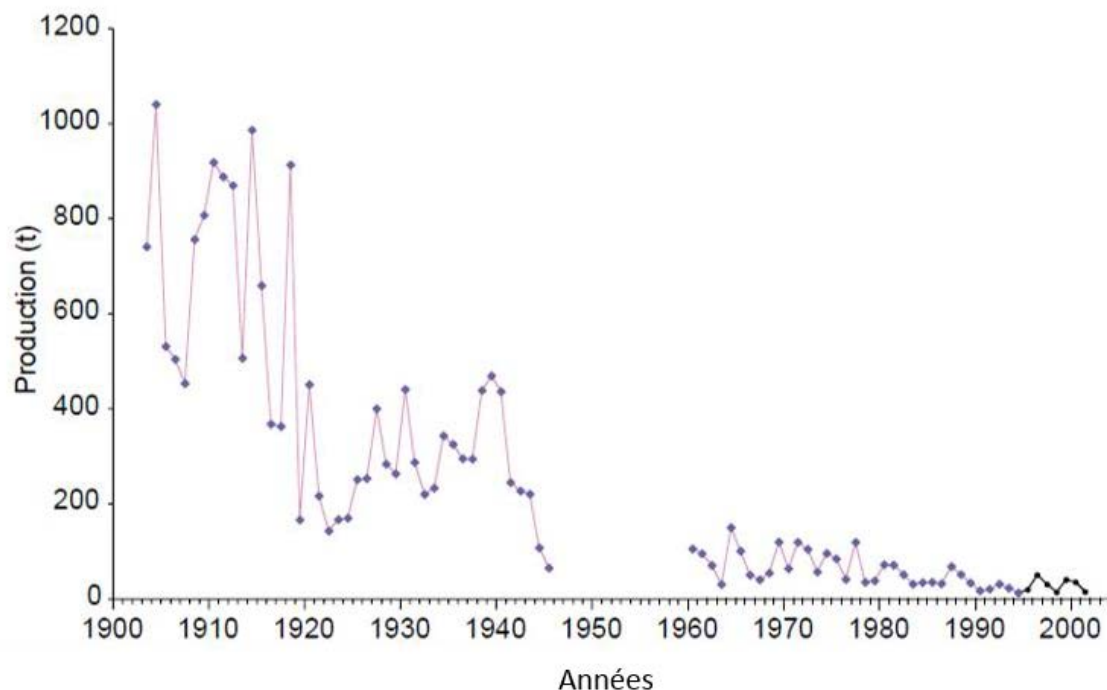
Une étude récente basée sur des **marqueurs moléculaires** combinés (ITS, LSU, EF1a, RPB2 ; Bonito *et al.*, 2013), a livré les caractéristiques de l'ancêtre commun des Tuberaceae, un champignon à fructification épigée associé à des angiospermes du Jurassique. La radiation des Tuberaceae aurait eu lieu à la fin du Jurassique (il y a 156 millions d'années), avant la **radiation évolutive** des angiospermes qui leur aurait conféré une large aire de distribution (Jeandroz *et al.*, 2008 ; Bonito *et al.*, 2013). Alors que les genres *Tuber* et *Choiromyces* semblent restreints à l'hémisphère Nord, les quatre autres genres de Tuberaceae (*Dingleya*, *Labyrinthomyces*, *Paradoxa*, *Reddellomyces*) se répartissent principalement dans l'hémisphère Sud et auraient divergé plus tôt (160 MA).

2.3 Les trufficultures d'hier à aujourd'hui

Traditionnellement, la production de Truffe noire résultait de cueillette, mais dès le XIX^e siècle, des techniques visant à cultiver la Truffe ont commencé à émerger avec la mise en place des premières plantations, avant même de connaître la nature ectomycorhizienne du champignon (Bosredon, 1887; Chatin, 1869). Précurseur reconnu dans le domaine, Joseph Talon préconisait déjà en 1810 le semis de glands, de préférence germés sous un arbre producteur. Des truffières furent également aménagées par ensemencement avec du sol provenant de truffières existantes (Kiefer, 1887). A cette époque, le développement de truffières par la gestion des espaces boisés (entretenus « en clairières ») était aussi

largement promu et le forestier Bédel, inspecteur des Eaux et Forêts dans le Vaucluse, soulignait en 1866 « l'importance toujours croissante et déjà considérable de la production des truffes dans Vaucluse, par la création et la culture raisonnée des forêts de chênes et d'yeuses [*Quercus ilex*], ce que nous pourrions appeler la sylviculture truffière » (dans Diette & Lauriac, 2004). La mise en place du plan de restauration des terrains de montagne par l'Administration des Eaux et Forêts au XIX^e siècle (1858), notamment des côteaux du Mont Ventoux, mena fortuitement à la création des plus grandes truffières alors connues. De plus, les forêts et les garrigues étaient à cette époque intensément exploitées par la population rurale, maintenant les milieux ouverts particulièrement favorables à la Truffe [Encadré 3]. De surcroît, le Phylloxéra ravagea de nombreuses parcelles de vignes qui, peu propices à d'autres cultures agricoles, se trouvèrent de fait converties en truffières, par plantation ou par simple reconquête forestière. La fin du XIX^e et le début du XX^e siècle furent l'âge d'or de la Truffe, avec une production annuelle estimée à 800 tonnes (Hall *et al.*, 2003). Cependant, les deux guerres mondiales, l'exode rural et l'évolution du mode de vie modifièrent radicalement les paysages, qui se refermèrent alors peu à peu, s'accompagnant d'une baisse considérable de la production de Truffe en France (Fig. 4) [Encadré 3].

Figure 4. Evolution de la production de Truffe au cours du XX^e siècle (repris de Hall *et al.*, 2003), principalement basée sur les chiffres des ventes de truffes effectuées sur les marchés.



Encadré 3 : L'homme et les écosystèmes méditerranéens du sud de la France.

Bordant le bassin Méditerranéen, la région méditerranéenne occupe environ 2 300 000 km², avec des limites variant en fonction des auteurs et critères utilisés. Cette région est classiquement caractérisée par :

- son climat, présentant une période estivale sèche et chaude imposant une phase annuelle de stress hydrique d'intensité variable en fonction de l'altitude,
- sa flore particulière, avec de nombreuses espèces endémiques.

La complexité et l'hétérogénéité des forêts méditerranéennes sont également des traits caractéristiques majeurs en comparaison d'autres forêts tempérées (Quézel & Médail, 2003), vraisemblablement accentués par une forte pression anthropique depuis l'âge de Bronze (Grove & Rackham, 2003). Les forêts sempervirentes à chênes de l'étage méso-méditerranéen sont dominés par le chêne vert (*Quercus ilex*) et le chêne kermès (*Q. coccifera*) qui représentent l'aboutissement d'une série dynamique progressive en l'absence de perturbation majeure.

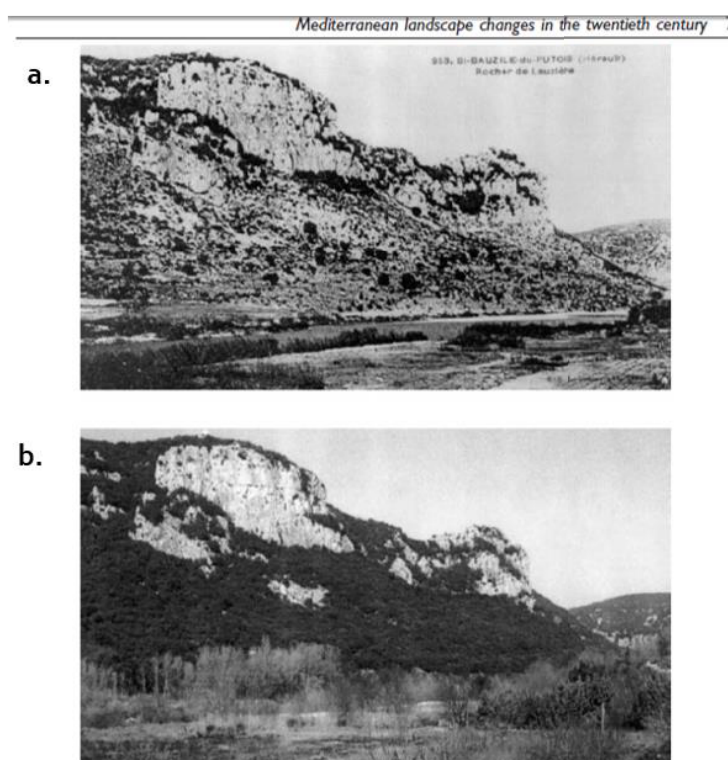
Voici un exemple simplifié d'une succession des communautés végétales sur substrats calcaires en Languedoc-Roussillon (adapté d'après Quézel & Médail, 2003) :

Pelouses à espèces vivaces (*Brachypodium* sp.) > **garrigues** (*Thymus vulgaris*, *Lavandula latifolia*, *Juniperus* spp., *Cistus* spp., *Pistacia lentiscus*) > **boisements ouverts** (*Cistus* spp., *Q. coccifera*, *Q. ilex*) > **forêt** (*Q. ilex*, *Q. pubescens*).

Le stade tardif des garrigues et pré-bois représente ce que nous appelons « stades de successions intermédiaires ».

Jusqu'au début du XX^e siècle, les forêts et garrigues étaient intensément exploitées par la population rurale, pour le bois de chauffage, le bois d'ouvrage, les charbonnières, le fourrage pour le bétail, les plantes comestibles etc., comme le racontent encore les anciens (Renaux *et al.*, 2011). Les paysages témoignaient par leur ouverture de l'intensité et de la diversité de ces activités. Au cours du dernier siècle, on assiste à une fermeture des milieux ouverts, avec une forte recrudescence des surfaces de forêts fermées, une diminution des habitats de succession intermédiaires (de 21 % estimés dans la zone du Pic Saint- Loup, au Nord de Montpellier), et une extension des zones urbaines en plaines (Sirami *et al.*, 2010).

Fig. E3. Changement d'un paysage au Nord de Montpellier, **a.** en 1929 (carte postale d'époque) puis photographié à la même saison, **b.** durant l'hiver 1992 (Debussche *et al.*, 1999).



Par ailleurs, ces épisodes ont marqué une rupture de la transmission des connaissances relatives à la cueillette en milieu sauvage et les savoirs faire traditionnels des campagnes (Renaux *et al.*, 2011), notamment en relation avec la Truffe. Au cours du dernier siècle, le modèle de production truffière évolua progressivement vers des parcours plus agricoles, notamment inspirés par l'arboriculture, et ce, dès les années 1920 (Callot *et al.*, 1999). La mise sur le marché de plants inoculés en 1973 marqua un virage décisif dans la trufficulture. En effet, plus de 300 000 plants sont actuellement vendus en France chaque année (Murat, 2014). Avec environ 1 000 ha de truffières plantées par an, la surface totale de truffières en France est estimée à 22 071 ha actuellement (Tourrette, 2014), contre 60 000 ha estimés en 1890 par Adolphe Chatin (dont 15 000 ha de truffières plantées). Mais comme cet auteur le notait dans son ouvrage de référence de 1869, « *Ce n'est pas chose facile que d'établir la statistique de la production truffière. Les éléments n'en existent nulle part réunis* » (Chatin, 1869).

Grâce à cet effort considérable de création de truffières, la production de Truffe en France se maintient entre 30 et 50 tonnes ces dernières années (com. pers., M. Courvoisier, Fédération Française des Trufficulteurs ; **Fig. 4**), provenant à 80% de plantations (Hall *et al.*, 2003). Plus globalement, la trufficulture s'est aussi étendue hors de sa zone d'origine avec de nombreuses plantations installées au Maroc, en Californie, en Nouvelle-Zélande et en Australie (8 tonnes produites en 2013 ; Büntgen *et al.*, 2015). En France, peu de truffes proviennent encore de cueillette en truffière sauvage (Tourrette, 2014), mais de nombreux trufficulteurs entretiennent encore des truffières apparues de façon spontanée. Ces pratiques sont à nouveau fortement encouragées par une approche multifonctionnelle de la gestion en forêt privée. A titre d'exemple, le Centre Régional de la Propriété Forestière (CRPF) Languedoc Roussillon anime un Centre d'Etudes Techniques et Economiques Forestières (CETEF) « Sylviculture truffière » où il oriente et conseille les propriétaires forestiers privés désireux de s'investir dans cette démarche [**Encadré 4**].

2.4 Etapes clés de la vie d'une truffière

Dans le propos qui suit, nous entendrons par truffière une parcelle de taille variable, regroupant plusieurs brûlés entretenus dans l'optique de produire de la Truffe. Comme évoqué précédemment, deux grands types de truffières sont à distinguer, les truffières spontanées et les truffières plantées. Les truffières spontanées (**Fig. 5a**) se développent de façon naturelle en formant des brûlés autour d'arbres d'âges variables, dans des espaces souvent issus de la déprise pastorale. Dans de telles zones, le trufficulteur continue parfois à « ouvrir » le milieu, *a priori* propice, afin de favoriser le départ de nouveaux brûlés alentours d'une truffière spontanée. L'action de l'homme sur ces truffières est très variable, allant d'interventions très modérées de type jardinage, jusqu'à des entretiens réguliers et plus intenses, consistant principalement à la limitation de l'embroussaillage et de la fermeture du milieu (taille, débroussaillage et/ou pâturage modéré), l'installation de clôtures prévenant le passage de sangliers (ou les bipèdes intéressés...) ainsi que l'irrigation estivale des zones de production. C'est compte tenu de l'importance des pratiques anthropiques avant et pendant le développement de telles truffières, que le terme de « truffière spontanée » est préféré à celui de « truffière naturelle » (**Fig. 5b**).

Figure 5. Truffière spontanée (**a.** chez P. Bernadach, Pyrénées-Orientales) et plantée (**b.** parcelle expérimentale du Grand St-Jean, Bouches-du-Rhône) et **c.** schéma des étapes clés en trufficulture.

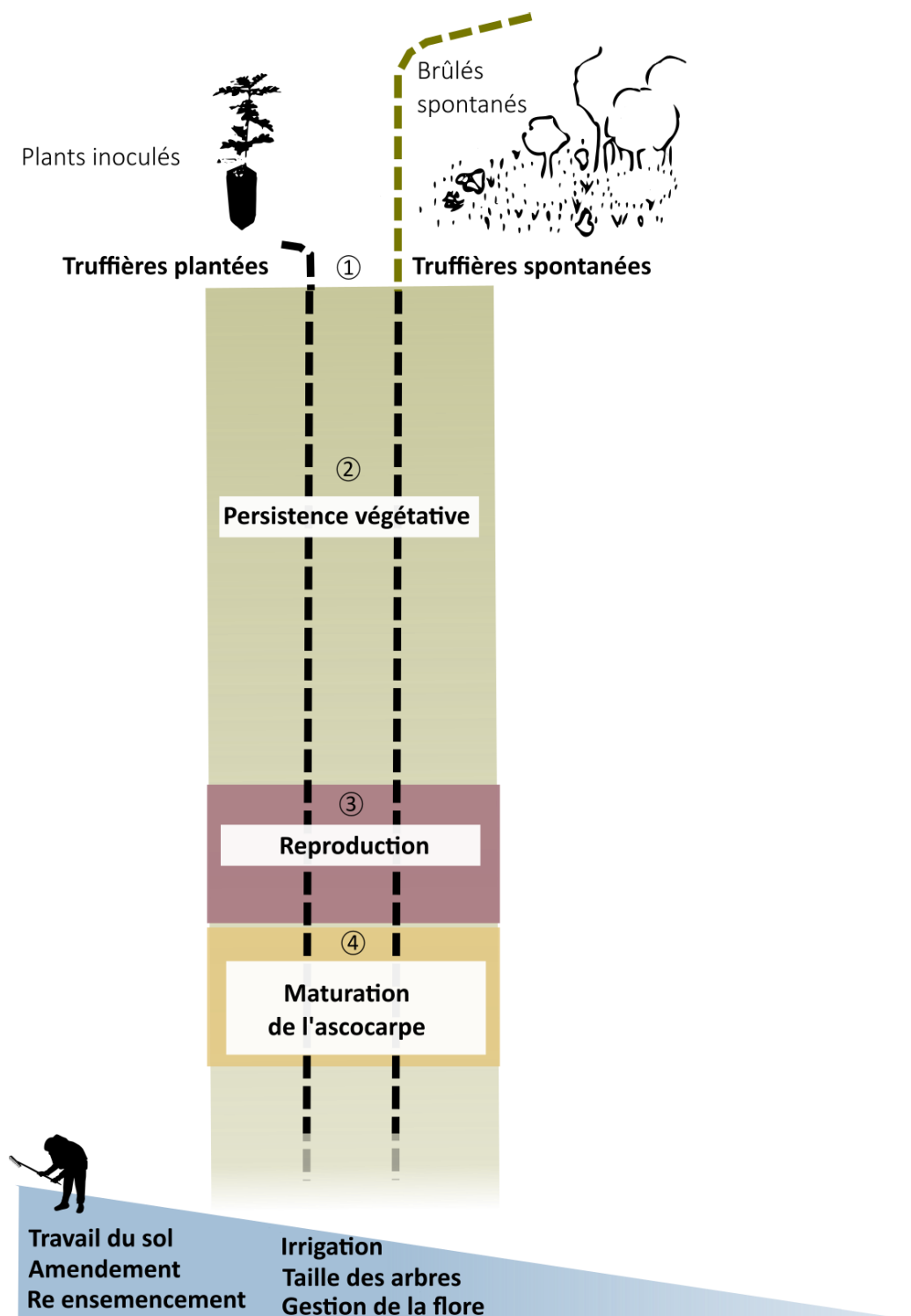
a.



b.



c.



Sur les truffières plantées (**Fig. 5b**), l'action de l'homme est généralement plus intense, focalisée tout d'abord sur la survie des jeunes plants, les premières marques du brûlé n'apparaissant que 3-4 ans après la plantation. Outre l'entretien des parcelles (taille, gestion de la flore, travail du sol, irrigation, *etc.* ; **Fig. 5c**), le trufficulteur continue souvent à ensemercer pour maintenir la présence, et/ou contribuer à la reproduction (Olivier *et al.*, 2012). La potentielle importance de la qualité des truffes choisies pour l'inoculum sur la qualité génétique de la population n'a que rarement été discutée jusqu'à présent (**Article 3**). Certains plants commencent à produire 5 à 10 ans après la plantation, mais de nombreux arbres, voire des parcelles entières, peuvent rester non productifs. La disparition complète de la Truffe pourrait dans certains cas en être la cause, mais ce problème concerne aussi des arbres sous lesquels la présence végétative d'ectomycorhizes de Truffe a été vérifiée (Agueda *et al.*, 2010 ; **Chapitre I**). De manière plus générale, le développement d'un brûlé n'est pas une garantie de production future de truffes, et les facteurs induisant la formation des ascocarpes du champignon, ainsi que les mécanismes impliqués dans cette phase du cycle biologique restent encore méconnus (**Chapitre III**). Lorsque les truffières sont productives, la maturation des ascocarpes reste un dernier point critique. Alors que les observations sur le terrain, comme des fouilles centimétriques du brûlé (Annie Guillen, comm. pers. ; Kulifaj, 1984) ou des détectations par sondage radio du sol (Pacioni *et al.*, 2014), indiquent que si les naissances sont nombreuses, beaucoup moins d'ascocarpes arrivent à maturité, propres à la vente (Pacioni *et al.*, 2014). Certains pourrissent, d'autres deviennent boisés (marbrés et durs) ou sont endommagés par la macrofaune du sol. Ainsi, quatre étapes clés de la trufficulture peuvent être identifiées : l'inoculation, le développement végétatif, la reproduction sexuée, et la maturation (**Fig. 5c**). Alors que l'inoculation est à présent en grande partie maîtrisée pour la Truffe, les autres étapes restent mal comprises, et on ne peut encore parler de domestication car son cycle de vie, notamment la reproduction, n'est pas complètement contrôlée. Néanmoins, le processus de proto-domestication est susceptible d'avoir déjà affecté la Truffe, et notamment sa diversité génétique (Zeder, 2015) qui reste à être évaluée (**Chapitre III**).

Au-delà des différences initiales entre truffières spontanées et plantées, les pratiques de cultures des truffières sont d'une grande diversité (Aumeeruddy-Thomas *et al.*, 2012). Ces pratiques reposent sur un vaste corpus de connaissances empiriques, et, derrière l'image trompeuse d'un socio-système plutôt fermé, se cache un actif réseau de partage de connaissances et d'expériences entre trufficulteurs passionnés [**Encadré 4**].

Encadré 4 : La filière de la Truffe

A l'échelle européenne, le Groupement Européen Truffe et Trufficulture (GETT) favorise les échanges entre les structures professionnelles des trufficulteurs des différents pays. En France, la Fédération Française des Trufficulteurs (FFT) a pour but de regrouper les projets autour de la Truffe au niveau national, en assurant la coordination entre les différentes structures, administratives, techniques et/ou scientifiques de la filière. Elle regroupe les fédérations régionales qui mènent des actions concertées, notamment des programmes d'expérimentation. Enfin, à l'échelle locale, les associations ou syndicats permettent les échanges entre trufficulteurs (Fig. E4-1). En 2006, le nombre de trufficulteurs était estimé à environ 15 000, dont près de 6000 adhérents à la FFT (Escafre & Roussel, 2006).

Les filières en amont (pépinières, outillages agricoles, etc.) et en aval (conserve, tourisme, etc.) de la production sont à considérer dans le chiffre d'affaire généré par la Truffe, qui reste cependant difficile à évaluer. De plus, la Truffe est un emblème culturel des régions productrices, notamment véhiculé par des confréries (associations conviviales) et des marchés qui attirent de nombreux visiteurs, avec jusqu'à 10 000 visiteurs à Lalbenque (46, Fig. E4-2) ou Uzès (30).



Fig. E4-1. Photo d'une visite de truffière organisée par les membres du Centre d'Etudes Techniques et Economiques Forestières (CETEF), afin d'exposer et de discuter des différentes pratiques de cultures mises en œuvre par chacun, ici dans l'Hérault, sur des truffières spontanées (printemps 2013, photo E. Taschen).



Fig. E4-2. Photo du marché très fréquenté de Lalbenque (hiver 2015, photo F. Richard).

3 Ecologie de la Truffe, ... ou avec qui co-existe-t-elle ?

3.1 La Truffe dans la communauté ectomycorhizienne

a- Structure des communautés ectomycorhiziennes

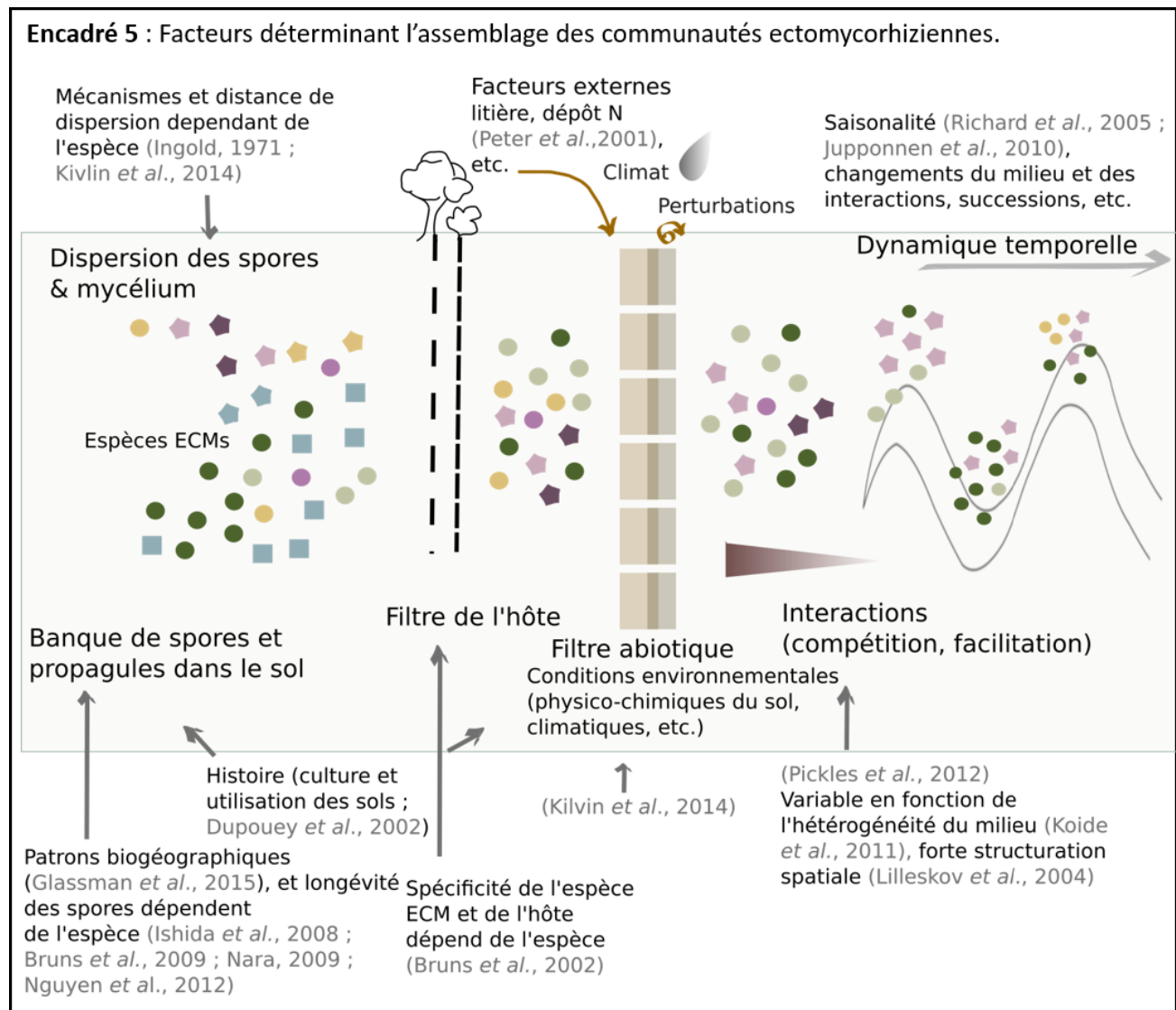
Pareil à une fenêtre ouverte sur l'invisible mycélium souterrain, le brûlé témoigne de la présence de mycélium de Truffe (Streiblová *et al.*, 2012; Suz *et al.*, 2008) dans un espace où elle coexiste avec de nombreuses autres espèces ectomycorhiziennes. Le rôle du trufficulteur est de créer et d'entretenir un milieu avantageux pour la Truffe, afin qu'elle se maintienne dans la communauté fongique ectomycorhizienne.

En écologie, une communauté est « un assemblage constitué de populations d'espèces interagissant entre elles (Whittaker, 1970 ; Tokeshi, 1993). Un focus est souvent réalisé sur un groupe taxonomique ou fonctionnel défini, ici les champignons ectomycorhiziens. Ces espèces occupent un même habitat, les racines fines des plantes hôtes. Comprendre les processus qui contrôlent l'assemblage des communautés est une question centrale en écologie. Alors que la théorie neutre suppose que ces assemblages sont le fruit d'évènements stochastiques, ou autrement dit, liés au hasard de la dispersion (Hubbell, 2001), la théorie des niches propose qu'un ensemble de facteurs biotiques et abiotiques régissent l'assemblage des communautés, reposant sur des traits fonctionnels spécifiques à l'espèce et l'adaptation aux conditions physico-chimiques de l'environnement (Whittaker *et al.*, 1973 ; McGill *et al.*, 2006). L'intégration de ces deux concepts de façon non-exclusive permet de mieux appréhender les facteurs structurant les communautés (Leibold & McPeck, 2006). De nombreux facteurs biotiques et abiotiques (interactions entre espèce, et contraintes du milieu aussi appelées filtres d'habitats; Koide *et al.*, 2011) semblent jouer un rôle important dans l'assemblage des communautés ectomycorhiziennes [Encadré 5], composé d'espèces différant dans leur **stratégie écologique** [Encadré 6] et défini par un ensemble de traits fonctionnels (Koide *et al.*, 2014). Pour définir la structure de ces communautés, il importe de déterminer la diversité, l'abondance et la répartition des espèces qui la composent. La description de ces communautés est généralement basée sur l'échantillonnage des ectomycorhizes identifiées à l'aide d'outils de biologie moléculaire explicités dans les grandes lignes dans l'**Encadré 6**. En effet, l'observation seule des fructifications est souvent fastidieuse et incomplète ; de plus, elle nécessite plusieurs saisons de suivi et se heurte à la faible détectabilité des nombreuses espèces à fructifications hypogées et cryptiques (croûtes). De plus, l'image des carpophores n'est pas celle des communautés observées au niveau des ectomycorhizes (Gardes & Bruns, 1996; Dahlberg *et al.*, 1997) car le lien entre l'abondance des fructifications et des ectomycorhizes dans le sol semble variable en fonction de l'espèce (Gardes & Bruns, 1996; Anderson *et al.*, 2014). De la même manière, l'abondance et la distribution spatiale du mycélium dans le sol diffère de celle observée au niveau des ectomycorhizes (Genney *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2014), les espèces n'investissant pas toutes de la même manière dans leurs différentes structures végétatives (ectomycorhizes et mycélium) et de reproduction (carpophores).

b- ... des brûlés dynamiques

En plantation, l'utilisation de plants inoculés garantit un système racinaire initialement majoritairement colonisé par la Truffe, lui conférant probablement un avantage sur les autres espèces ectomycorhiziennes (*priority-effect* ; Kennedy & Bruns, 2005; Kennedy *et al.*, 2009, 2010). Mais que se passe-t-il au niveau des communautés ectomycorhiziennes lorsque le brûlé se déclenche spontanément ? Ces communautés évoluent dans le temps et la présence de certains champignons

est parfois considérée comme « annonciatrice » de la production de Truffe (Pierre Bernadach, comm. pers. ; Olivier *et al.*, 2012). De la même manière, il est communément dit que « *si la forêt se referme, d'autres champignons remplacent la Truffe* ». Cette connaissance empirique traduit sans doute une évolution lors du vieillissement du peuplement et la fermeture du milieu, par ailleurs bien connue des communautés fructifiantes et souterraines (Last *et al.*, 1987 ; Visser, 1995; Kranabetter & Friesen, 2002). La dynamique sous-jacente des communautés ECMs tout au long de la vie d'une truffière, de sa « naissance » à son extinction, n'a jamais été étudiée et fait l'objet du **premier chapitre** de cette thèse.



c- L'association ectomycorhizienne : une relation non spécifique

Chez les champignons ECMs, il existe un gradient de spécificité (Bruns *et al.*, 2002), avec des espèces généralistes à très large gamme d'hôtes et des espèces à interaction spécifique avec des hôtes restreints à un même groupe taxonomique, à l'échelle de la famille (exemple des *Suillus* associés aux Pinacées ; Bruns *et al.*, 2002), du genre ou rarement de l'espèce. Ce gradient existe réciproquement

pour les plantes ECMs. Ainsi, une même espèce, voire un même individu génétique (ou génet) de champignon ECM peut coloniser simultanément plusieurs espèces de plantes hôtes, formant un réseau commun entre celles-ci (Common Mycorrhizal Network, CMN ; Selosse *et al.*, 2006). De telles interactions plantes-champignons jouent un rôle prépondérant dans les processus écologiques façonnant les communautés végétales et leur productivité (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Wardle *et al.*, 2004). Des études ont montré que le succès d'établissement des plantes ECMs dépend fortement de la présence d'un inoculum compatible (Smith & Read, 2008 ; Pringle *et al.*, 2009), et de la présence de CMNs alimentés par des plantes en place. Ainsi, la présence d'inoculum peut faciliter l'établissement de jeunes plantules et permettre rapidement une « connexion » à des partenaires fongiques déjà établis (Dickie & Reich, 2005 ; McGuire, 2007 ; Nara, 2006). Cette facilitation peut jouer un rôle important dans les successions végétales (Selosse *et al.*, 2006), primaires (Nara, 2006) ou secondaires, comme cela a été décrit dans le cas des recolonisations en Corse, où l'arbousier (*Arbutus unedo*, Ericaceae) favorise l'établissement du chêne vert (*Quercus ilex*, Fagacées ; Richard *et al.*, 2009), et l'*Arctostaphylos* favorise celui du Pin d'Oregon (*Pseudotsuga menziesii* ; Horton *et al.*, 1999). Les champignons partagés peuvent créer un réel réseau physique entre leurs hôtes, potentiellement impliqué dans le transfert direct de carbone via le mycélium (Simard *et al.*, 1997) et jouent un rôle prépondérant pour certaines espèces, notamment d'orchidées et d'éricacées, qui sont devenues mixotrophes en exploitant la photosynthèse des plantes voisines par champignons interposés (Selosse & Roy, 2009). Ce transfert direct peut aussi être impliqué dans les processus de facilitation entre espèces tels que ceux mis en évidence dans l'expérience fondatrice de l'étude des CMNs, entre Pins Douglas et Bouleaux, de Simard *et al.* (1997). Cependant le bénéfice réel de ces interactions pour chaque partenaire semble très variable en fonction des espèces et du milieu (Van Der Heijden & Horton, 2009 ; van der Heijden *et al.*, 2015) ; plus d'investigations semblent encore nécessaires pour mieux comprendre les fonctions biologiques et écologiques sous-jacentes (Robinson & Fitter, 1999 ; Caruso *et al.*, 2012).

d- ... et qu'en est-il pour la Truffe ?

La Truffe est inféodée à des milieux de colonisation secondaire composés d'une mosaïque végétale où plusieurs espèces de plantes ectomycorhiziennes coexistent avant la fermeture de la canopée (**Fig. 5a ; Encadré 3**). Paradoxalement, la présence de la Truffe sur des hôtes potentiels, tels que les Pinaceae et les Cistaceae, a été peu étudiée. De manière plus globale, la diversité ectomycorhizienne des milieux de transitions, largement rependue dans la région méditerranéenne et constituant un rôle écologique important [**Encadré 3**], reste peu connue. L'analyse de cette diversité ainsi que le taux de partage ECMs entre les plantes co-occurentes sont abordés dans le contexte de la Truffe dans le **premier chapitre** de cette thèse.

Encadré 6 : La notion de stratégie écologique.

La notion de stratégie écologique définit la classification de types fonctionnels basée sur l'écophysiologie (utilisation des ressources, rétablissement après perturbation) et la biologie reproductive d'une espèce (Andrews, 1992). Elle a été initialement inspirée par les travaux fondateurs de MacArthur et Wilson (1967), qui utilisent les paramètres d'une courbe de croissance logistique pour opposer les espèces à reproduction dominante (r) de celles à forte croissance végétative (K). Le modèle r-K a été redéfini par Grime (1977) qui distingue les stratégies rudérale (R ; sélectionnée en environnement perturbé, fait d'espèces pionnières, à compétitivité faible, temps de vie court, et potentiel reproducteur élevé), compétitive (C ; sélectionnée par la compétition, efficace dans l'exploitation des ressources sans stress et en niveau de perturbation faible, à fort investissement végétatif), et tolérante au stress (S ; adaptée au stress, évite la compétition, investit peu dans la reproduction, mais parvient à gérer les conséquences de milieux contraignants où peu de compétiteurs existent).

Encadré 7 : Identifier les champignons et leurs hôtes : techniques de biologie moléculaire.

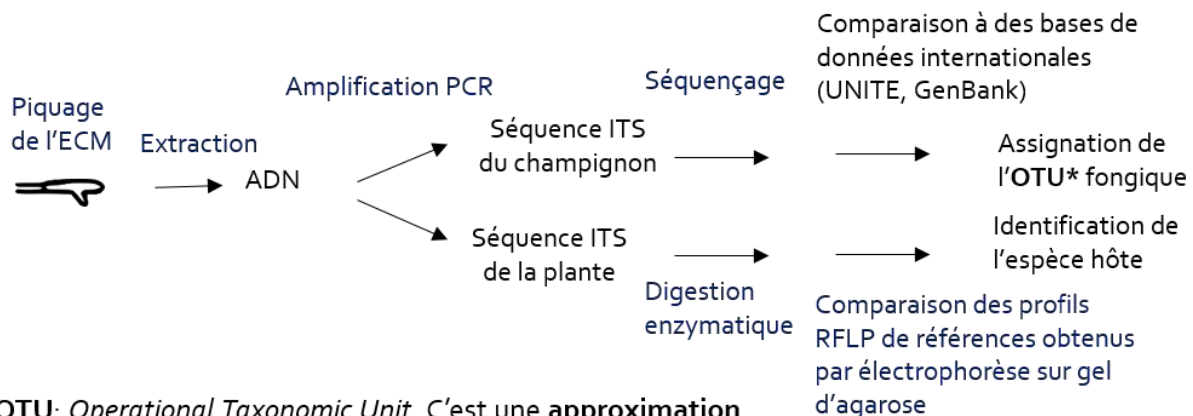
Une vision souterraine de la communauté est acquise en échantillonnant l'appareil végétatif visible des champignons, les ectomycorhizes (ECMs).

Leur échantillonnage s'effectue par piquage sur les racines (Fig. E7). Les ECMs peuvent être triées sur la base de leurs morphotypes (couleur, longueur des hyphes, etc.; Agerer 2001), mais l'identification des espèces nécessite le plus souvent un recours à la biologie moléculaire. Lorsqu'on étudie les cortèges spécifiques de plusieurs plantes qui coexistent, il est préférable de s'assurer de l'espèce hôte de l'apex racinaire étudié.

Dans notre étude (**Chapitre I, Article 1**), les espèces fongique et végétale de chaque apex racinaire ont été identifiées par le procédé suivant:

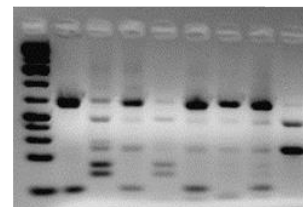


Figure E7. Diversité des ECMs échantillonnées dans une seule carotte de sol (10 cm de diam.; 15 cm profondeur) sous chêne vert (Photo E. Taschen).



* OTU: *Operational Taxonomic Unit*. C'est une **approximation de l'espèce** souvent utilisée en écologie moléculaire et en identification des microorganismes. Une OTU regroupe les individus en fonction de leur similitude sur une portion de l'ADN (généralement l'ITS; Schoch *et al.*, 2012), souvent fixée à 97% d'identité chez les champignons (Hughes *et al.*, 2009).

Cette notion de l'espèce est-elle moins « vraie » que les espèces taxonomiques que l'on connaît ? La notion d'espèce est développée dans l'Encadré A1 en annexe.



3.2 La Truffe et les plantes non-ectomycorhiziennes

a- Barrières floues entre colonisation mycorhizienne et endophytisme

Le type d'association mycorhizienne développé par une espèce de champignon peut dans certains cas être multiple (van der Heidjen *et al.*, 2015), notamment pour les champignons qui colonisent simultanément des plantes ECMs et des plantes mycohétérotrophes, où ils forment des endomycorhizes à pelotons (**Fig. 1**; Selosse *et al.*, 2004). Des familles fongiques ayant évolué plus récemment vers des formes d'associations mycorhiziennes éricoïdes (e.g. Sebaciniales et Helotiales) et

à pelotons chez les orchidées (e.g. Ceratobasidiaceae, Tulasnellaceae et Sebaciniales) ont aussi des phases de vie saprotrophe, libre, dans le sol [Encadré 1] et colonisent parfois des racines de façon endophytique (van der Heijden *et al.*, 2015), c'est-à-dire cryptique, car asymptomatique. D'autres ordres tels que les Helotiales ou la famille des Hygrophoraceae regroupent des espèces endophytes et ectomycorhiziennes (Seitzman *et al.*, 2010 ; Tedersoo & Smith, 2013). L'analyse des champignons associés à *Epipactis microphylla* (Orchidaceae) a montré que 78% des fragments de rhizomes étudiés étaient colonisés par des espèces de *Tuber* (Selosse *et al.*, 2006), et *T. melanosporum* a été identifié colonisant les rhizomes de *Limodorum abortivum* (Orchidaceae ; Girlanda *et al.*, 2006). Comme le suggère aussi une étude récente démontrant l'interaction entre le champignon ECM *Tricholoma matsutake* et un arbre non-ECM, *Cedrela odorata* (Murata *et al.*, 2013), la capacité des champignons ECMs à former d'autres types d'associations avec des hôtes non attendus a peut-être été sous-estimée. La capacité de la Truffe à coloniser les racines des plantes non-ectomycorhiziennes a fait l'objet d'une première étude abordée dans mon **troisième chapitre de thèse**.

b- Le brûlé, des interactions plantes-champignons mal connues

Les brûlés sont souvent bien visibles au sein de la végétation environnante (Fig. 3). Pourtant, aucune description de leur impact sur la diversité et l'abondance des espèces végétales n'a pu être établie : il s'agit d'une zone où la végétation semble moins dense et composée d'une flore qui se distingue de celle des alentours (Fig. 3), notamment par la prépondérance d'espèces thérophytes (Martegoute & Courdeau, 2002; González-Armada *et al.*, 2010). En effet, certaines espèces pourtant abondantes autour du brûlé semblent très peu présentes dans cette zone, et au printemps, certaines plantes présentes sur le brûlé commencent à rougir (Fig. 3). Les relevés de terrain semblent indiquer que certaines espèces végétales semblent mieux persister que d'autres (Martegoute & Courdeau, 2002 ; Olivier *et al.*, 2012). On ignore la cause de l'apparition de ces brûlés mais leur existence suggère l'existence d'une interaction entre la strate microbienne et la strate herbacée dans laquelle dominent les plantes non-ectomycorhiziennes, le plus souvent, à mycorhizes arbusculaires (AM) (§1.2, Fig. 1). Il semblerait que des brûlés similaires soient induits par d'autres espèces de champignon, notamment des russules (com. pers. de certains mycologues), mais à notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée sur ce phénomène. Des essais en laboratoire ont montré que ces effets pourraient être dus à des composés organiques volatiles émis par le mycélium de Truffe qui induisent un *burst* oxydatif (1-Octen-3-ol et trans-2-octenol sur *Arabidopsis thaliana* ; Splivallo *et al.*, 2007) et modifient le développement racinaire de plantes ecto- et non-ectomycorhiziennes (éthylène et acide indole 3-acétique, testé sur *Cistus incanus* et *Arabidopsis thaliana* ; Splivallo *et al.*, 2009). Ces potentiels effets allopathiques ou « herbicides » de plusieurs espèces de truffes ont été testés en laboratoire par des extraits de carpophores ou des composés de synthèses (Pacioni, 1991; Splivallo *et al.*, 2007, 2009; Angelini *et al.*, 2014) mais il est souvent délicat de transposer les résultats observés aux mécanismes observés *in situ*. Ayant mis en évidence la colonisation racinaire de deux espèces de plantes à endomycorhizes arbusculaires par la Truffe (par immuno-détection), Plattner & Hall (1995) avaient avancé l'hypothèse d'un parasitisme direct du champignon sur les plantes, en partie appuyée sur des dommages racinaires observés. L'hypothèse d'une interaction parasite cependant moins intime (sans colonisation intra-racinaire) a été reprise par Gryndler *et al.* (2014), montrant que la truffe d'été (*T. aestivum*) colonise la surface racinaire de plantes non-ectomycorhiziennes. Cependant le rôle et le fonctionnement biologique de ces interactions ne sont pour le moment que spéculatifs et restent à être mieux compris. Cette question est abordée dans le **second et le troisième chapitres** de cette thèse.

c- Gestion de la flore des truffières

Alors que dans les truffières spontanées, plusieurs strates (arborescentes, arbustives et herbacées) se superposent, les strates intermédiaires et basses sont souvent en grande partie éliminées en plantation (**Fig. 5b**). Certains trufficulteurs agissent de façon radicale, tandis que d'autres orientent le cortège floristique de leur truffière avec une attention particulière pour les plantes qui poussent dans ou à proximité des brûlés. Un des premiers manuels de trufficulture relatait déjà qu' « *il existe des arbustes qui, sans être producteurs eux-mêmes, secondent si heureusement l'action des arbres truffiers, que s'il s'en trouve dans leur voisinage, ce sera toujours au pied de leur tronc, ou près de leur racines que les tubercules viendront se former* » (Bosredon, 1887, Chapitre XI, p.95), et « *s'il est, en effet des plantes et des arbres qui, associés aux chênes, secondent leur action pour la formation des tubercules, il en est d'autres qui leur sont nuisibles et qu'il faut prescrire sans hésiter* » (Bosredon 1887, Chapitre XI, p.93). Il existerait ainsi, d'après les connaissances empiriques des trufficulteurs (Bosredon 1887 ; Olivier *et al.*, 2012 ; de nombreuses communications personnelles de trufficulteurs) des plantes qui favorisent le développement de la Truffe. Cependant, hormis une expérience sur l'effet du semis de Fétuque ovine (*Festuca ovina*, espèce de Poacée souvent citée comme favorable) et le taux de mycorhization de très jeunes plants de noisetiers par Mamoun & Oliver (1997), aucune étude n'a été réalisée sur les potentiels effets facilitateurs de plantes compagnes non-ectomycorhiziennes sur la Truffe. Par une approche expérimentale, cette hypothèse fait l'objet du **second chapitre** de cette thèse.

d- Des interactions indirectes entre plantes

De la même manière que les racines constituent en partie la niche écologique des champignons mycorhiziens, les symbiontes microbiens (fongiques et bactériens) participent à déterminer la niche écologique des plantes hôtes. Et comme illustré précédemment (§3.1) par les exemples de facilitation via les réseaux d'ECMs dans les successions végétales, la composante microbienne du sol joue un rôle prépondérant dans les processus qui régissent la composition des communautés végétales (van der Heijden 1998 ; Maherali & Klironomos, 2007 ; McIntire & Fajardo, 2014). Alors que les interactions plante-plante étaient classiquement envisagées en terme de compétition directe pour les ressources (espace, nutrition, ensoleillement, eau), il apparaît que de nombreuses interactions indirectes (positive et négative) entre plantes sont médiées par les communautés microbiennes (Bever *et al.*, 1997, Bever, 2002 ; van der Putten *et al.*, 2013). Cependant, ces études se sont majoritairement intéressées aux interactions entre plantes de même type d'associations mycorhiziennes et peu se sont penchées sur les interactions entre plantes ECM et AM. Le brûlé, où plantes ECM et AM coexistent et interagissent vraisemblablement avec une même espèce ECM de champignon présente un cas d'étude particulièrement propice et a été abordé dans le **chapitre II**, d'autant plus que le principal médiateur microbien est ici identifié : la Truffe.

4 Biologie de la Truffe, ... ou comment se reproduit-elle ?

4.1 Dynamique des populations : lien à la stratégie écologique des champignons ECMs

Pour se maintenir localement, la **population** (ensemble d'individus d'une même espèce) doit coloniser de nouvelles racines, soit par croissance du mycélium d'individus déjà présents, soit par recrutement de nouveaux individus. Comprendre la dynamique des populations, c'est-à-dire, comment les **génets** (individus définis par leur génotype) s'établissent, se maintiennent et coexistent

spatialement et temporellement, permet de mieux comprendre la **stratégie écologique** [Encadré 6] d'une espèce.

Initialement décrites au sein des successions (Mason *et al.*, 1987 ; Fleming, 1983 ; Last *et al.*, 1987), les espèces *early-stage* colonisent rapidement les jeunes plants et sont présentes dans les jeunes forêts associées à des milieux perturbés, alors que les espèces *late-stage* sont inféodées aux arbres âgés des forêts matures, et aux milieux à faible perturbation. Cependant cette dichotomie explique mal des patrons qui semblent plus continus, variables en fonction des habitats et des espèces (Taylor & Bruns, 1999). Les premières études de génétique des populations appliquées aux champignons en général (Andrews, 1992) et aux ECMs (Dahlberg & Stenlid, 1990, 1994) relient ces stratégies écologiques à la prépondérance d'un développement asexué *vs.* sexué de la population. Ainsi, les espèces ECMs constituant des populations avec peu de génets de grande taille sont des espèces *late-stage* (de stratégie C ou S ; Grime, 1977), avec un développement à dominante végétative par croissance du mycélium, alors que les espèces présentant de nombreux petits génets sont des espèces *early-stage* (de stratégie R ; Grime, 1977), se développant principalement en investissant dans la reproduction sexuée et *via* le recrutement de nouveaux génets issus de spores méiotiques.

De nombreuses études se sont appuyées sur ces concepts, remis en question par de nombreuses exceptions, mais restant cependant utiles comme canevas de travail (Douhan *et al.*, 2011). Pour n'évoquer que deux exemples contrastés, certaines espèces telles que le matsutake (*T. matsutake*) forment de très grands génets probablement issus d'expansion pluriannuelle du mycélium (Amend *et al.*, 2009), alors que d'autres espèces telles que *Hebeloma cylindrosporum* (Guidot *et al.*, 2004) ou *Laccaria amethystina* (Gherbi *et al.*, 1999) forment de petits génets dont peu persistent d'une saison à l'autre avec un important renouvellement de génets, pouvant néanmoins coexister sur un même site avec des espèces formant des génets plus étendus et persistants (*Xerocomus chrysenteron*, *X. pruinus* ; Fiore-Donno & Martin, 2001).

L'inférence de stratégies écologiques sur la taille des génets reste néanmoins assez limitée et se confronte à de nombreux obstacles (problème d'échantillonnage et de détection, temps de suivi limité, restriction à la phase de reproduction, *etc.* ; Douhan *et al.*, 2011). L'importance de nombreux traits de vie fondamentaux sur la structure génétique des populations de champignons ectomycorhiziens, tels que le mode de dispersion (*i.e.* par les animaux pour la Truffe), le mode d'appariement entre partenaires *etc.* restent encore peu connus. Les outils méthodiques et conceptuels de la génétique des populations [Encadré 8] permettent de mieux comprendre les mécanismes biologiques intrinsèques à la biologie reproductive de l'espèce, mais restent très rarement appliqués aux ascomycètes ECMs (Douhan *et al.*, 2011).

Encadré 8 : Génétique des populations ; concepts et outils.

Concepts

Un individu peut être décrit par son génotype, c'est-à-dire l'assemblage de ses **allèles** au sein de son génome. A l'échelle de la population, la structure génétique est la fréquence des différents **génotypes** ou des fréquences alléliques à différents **locus**. Le polymorphisme allélique résulte de mécanismes évolutifs (recombinaison, mutation) et la composition génétique des populations est liée à des processus intra- et inter-populations (sélection naturelle, régime de reproduction, dérive génétique, et migration).

Les bases de la génétique des populations dérivent d'une mise en équation des principes d'hérédité (Mendel, 1865) et de la théorie darwinienne (1859) par des mathématiciens (Fisher) et des biologistes (Haldane, Wright) qui ont construit à partir des années 1920 des modèles décrivant l'évolution des populations (Henry & Gouyon, 1999). L'analyse de la structure des populations à différentes échelles (Fig. E8) peut, par inférences probabilistes basées sur **des modèles de génétique des populations**, permettre de comprendre les mécanismes qui façonnent les populations, comme par exemple dans notre cas (Chapitre III), le **régime d'appariement** des individus et les **flux de gènes** entre populations (Rousset, 1997).

Processus individuels :

mutation
recombinaison

Processus intra-populationnels :

flux de gènes
régime de reproduction
sélection naturelle
dérive génétique

Processus inter-populationnels :

flux de gènes *

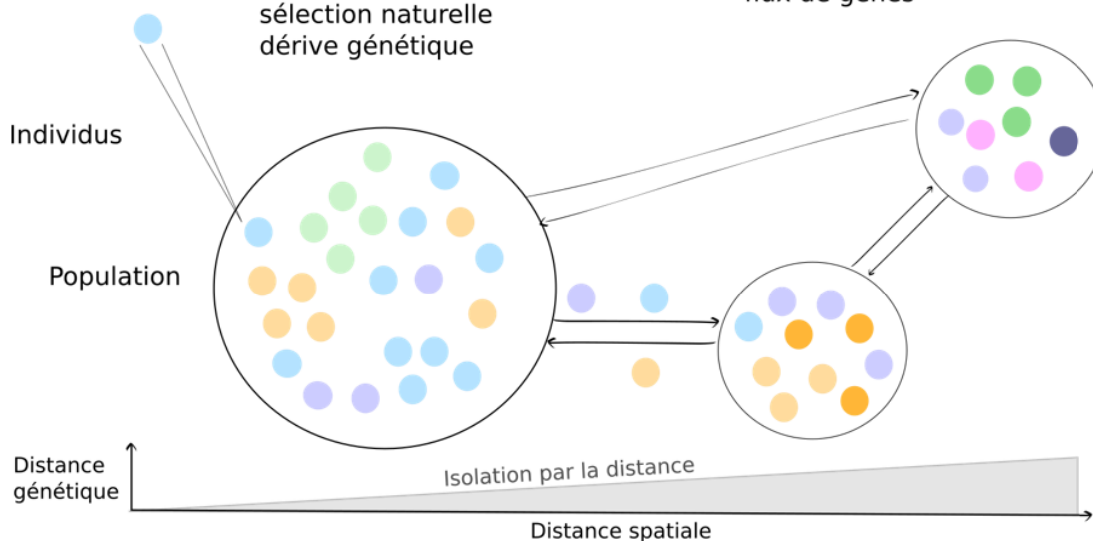


Fig. E8. Processus modélisant la structure génétique des populations. Schéma inspiré de Vincenot 2009. *

Le flux de gènes peut s'effectuer chez les champignons par fragmentation du mycélium, dispersion des spores (méiotiques), et chez les ascomycètes éventuellement par dispersion des conidies (spores mitotiques) ou spermaties lorsqu'elles font office de gamètes.

Les marqueurs microsatellites

Le principe du marquage moléculaire est basé sur le polymorphisme de l'ADN. Les marqueurs microsatellites sont de courtes séquences d'ADN répétées en tandem, et dont le nombre de répétitions est variable (Jarne & Logoda, 1996). Leur présence dans les régions codantes ou non codantes de l'ADN (soumis ou non à la sélection), leur taux de mutation important (augmentant la possibilité de discrimination), leur caractère codominant (permettant de détecter la présence de plusieurs allèles à un locus donné) et leur bonne détectabilité par des techniques répétables (amplification par *Polymerase Chain Reaction*, PCR) en font des marqueurs très utilisés.

Glossaire : éléments de biologie et de génétique

Allèle : une des versions différentes d'un même locus ou gène.

Caryogamie : fusion des deux noyaux présents dans la cellule suite à un évènement de plasmogamie. C'est une des étapes de la fécondation.

Conidie : spore issue d'une multiplication végétative.

Flux de gènes : terme englobant tous les mécanismes dont résultent les mouvements de gènes entre populations.

F-statistiques de Wright (1931) : définissent trois indices (F_{IS} , F_{ST} et F_{IT}), fondés sur les calculs d'hétérozygotie observées et attendues sous l'hypothèse d'Hardy-Weinberg.

F_{IS} : déficit en hétérozygotes à l'intérieur d'une sous-population, il permet d'estimer la différenciation des individus. Aussi dénommé indice de fixation ou coefficient de consanguinité (Wright, 1969), il permet d'estimer l'importance de l'autofécondation au sein d'une population (F_{IS} tendant vers +1: homozygotie excédentaire (~ autofécondation) ; F_{IS} tendant vers < 0, hétérozygotie excédentaire).

F_{ST} : déficit en hétérozygotes dû à la différenciation entre sous-populations, il permet d'estimer la différenciation entre populations.

F_{IT} : déficit global en hétérozygotes sur l'ensemble des populations.

Génet : correspond à l'individu en tant qu'entité génétique ; il peut être fractionné en plusieurs **ramets** (unités anatomiques).

Génotype : composition allélique d'un individu, défini sur l'ensemble ou une portion de ses gènes.

Incompatibilité végétative : système multigénique d'incompatibilité bloquant physiquement la fusion entre individus dissimilaires.

Incompatibilité sexuelle : système monogénique diallélique (chez les ascomycètes) ou le plus souvent bigénique multiallélique (chez les basidiomycètes) empêchant la reproduction entre deux individus identiques à ce(s) locus.

Isolation par la distance : patron de la structure génétique lorsque la limitation du flux de gènes entre populations (continues ou discontinues) croît avec la distance spatiale. En population continue, on s'attend ainsi à un accroissement de la différenciation génétique avec la distance (Wright, 1943). Lorsque la population est représentée en deux dimensions, la distance génétique $\hat{a}$ est approximativement corrélée au logarithme de la distance d tel que $\hat{a} \approx (\ln(d)/4\pi D \sigma^2) + \text{constante}$, où D est la densité des individus capables de se reproduire, et σ^2 la distance axiale moyenne entre les parents et leur descendance. La **taille de voisinage** peut ainsi être estimée à partir de l'inverse de la pente de régression, soit $4\pi D \sigma^2$.

La statistique $\hat{a}$: (utilisée dans l'Article 4) est une généralisation de la distance génétique $F_{ST}/(1-F_{ST})$ entre paires d'individus, proposée par Rousset (2000).

Locus : lieu physique du gène sur un chromosome. En français, pluriel invariant (des locus).

Méiose : division qui fait passer une cellule de l'état diploïde (deux exemplaires d'information génétique, $2n$) à des cellules haploïdes, les spores chez les champignons, avec recombinaison des chromosomes (brassage de l'information génétique), parfois suivie d'une mitose.

Mitose : division d'une cellule pour en former deux identiques.

Plasmogamie : fusion des cytoplasmes de deux cellules sans fusion des noyaux, c'est une des étapes de la fécondation.

Population : ensemble d'individus d'une même espèce interagissant sur un territoire donné (souvent défini arbitrairement).

suite Glossaire : éléments de biologie et de génétique

Régime d'appariement : façon dont les gamètes s'assemblent au sein de la population pour former la génération suivante : on distingue la panmixie (union des gamètes au hasard), la consanguinité (union entre individus apparentés) et l'autogamie (reproduction par autofécondation).

Spermatie : gamète mâle haploïde issu d'une multiplication végétative, à mobilité passive.

Taille de voisinage : relié à la densité des individus (D) et aux distances moyennes de dispersion des gènes par génération (distance axiale σ ; voir **Isolation par la distance**).

Zygote : résultant de l'union de deux gamètes haploïdes par le processus de fécondation.

Encadré 9 : Les avantages évolutifs du sexe.

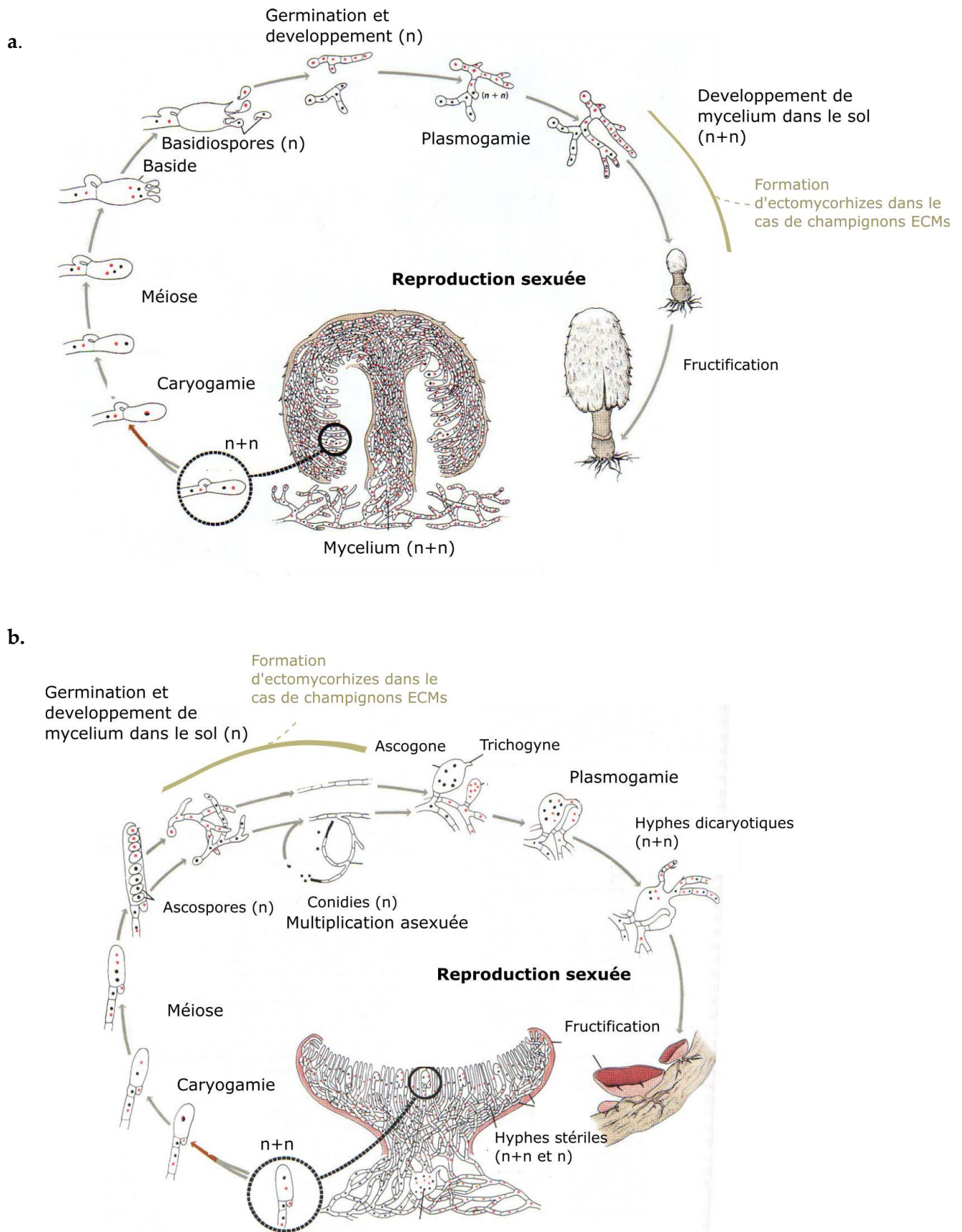
La part relative des reproductions sexuée et asexuée est variable en fonction des espèces. Alors que la reproduction asexuée (dite aussi végétative ou clonale) assure une extension voire une dispersion à coût moindre, la reproduction sexuée est garante d'un certain niveau de brassage génétique et/ou d'une purge des mutations délétères grâce à la recombinaison et la ségrégation des chromosomes lors de la méiose. Toutefois, la reproduction sexuée engendre un coût de rapprochement des partenaires (en cas d'allogamie) et entraîne la disruption de combinaisons adaptées, peut-être désavantageuse. Le bilan dépend aussi du type d'environnement biotique et abiotique (stable ou changeant ; Zeyl & Bell, 1997 ; Smith 1971). L'avantage évolutif et le maintien de ces deux modes de reproduction (sexuée et asexuée) au cours de l'évolution restent largement discutés (Billiard *et al.*, 2011 ; Otto, 2009 ; Lehtonen *et al.*, 2012) ; de plus, de nombreux organismes ont recours aux deux modes.

4.2 La reproduction chez les champignons : les mécanismes impliqués

a- Reproduction sexuée et asexuée

La **reproduction asexuée** peut s'effectuer par bouturage de mycélium ou par des spores asexuées, appelées **conidies** (**Fig. 6**). Issue de mitoses peu coûteuses en énergie, elles sont le plus souvent absentes chez les champignons ECMs, notamment les Basidiomycètes. Des conidies, souvent nombreuses et de petites tailles, existent chez certains Ascomycètes (Healy *et al.*, 2013 ; Guidot *et al.*, 2003) où elles ne serviraient pas à établir de nouveaux mycéliums, mais des gamètes mâles pour la reproduction sexuée. Elles doivent, dans ce cas, être appelées **spermaties**. La **reproduction sexuée** implique la plasmogamie (fusion de cellules haploïdes), suivie de la caryogamie (fusion des noyaux, rétablissement de la diploïdie) et de la **méiose** (**Fig. 6**), produisant les spores haploïdes (n). L'importance du développement entre plasmogamie et caryogamie est variable et représente la différence majeure entre les cycles de vie des Ascomycètes et Basidiomycètes (**Fig. 6**). Alors que la phase végétative (phase dominante) repose chez les Ascomycètes sur le développement d'un mycélium haploïde (n), chez les Basidiomycètes cette phase est dominée par le développement d'un mycélium issu de fécondation (dicaryotique, n+n). De plus, les mycéliums végétatifs peuvent interagir en fusionnant par anastomose entre hyphes. La fusion végétative s'effectue seulement entre individus génétiquement proches ou identiques, évitant tout échange entre deux individus génétiquement différents entre lesquels la fusion conduit à la mort cellulaire (Worrall, 1997 ; Glass & Fleissner, 2006). Cette **incompatibilité végétative** est régulée, avant ou après fusion des hyphes (Glass *et al.*, 2000), par un ensemble de gènes polymorphes, caractérisés pour seulement un petit nombre d'espèces (Iotti *et al.*, 2012). Elle restreint la mise en commun des ressources à la parentèle.

Figure 6. Cycles de reproduction d'un Basidiomycète (a. *Coprinus sp.*, non ECM) et d'un Ascomycète (b. *Peziza sp.*, non ECM) (schémas adaptés de Raven *et al.*, 2000).

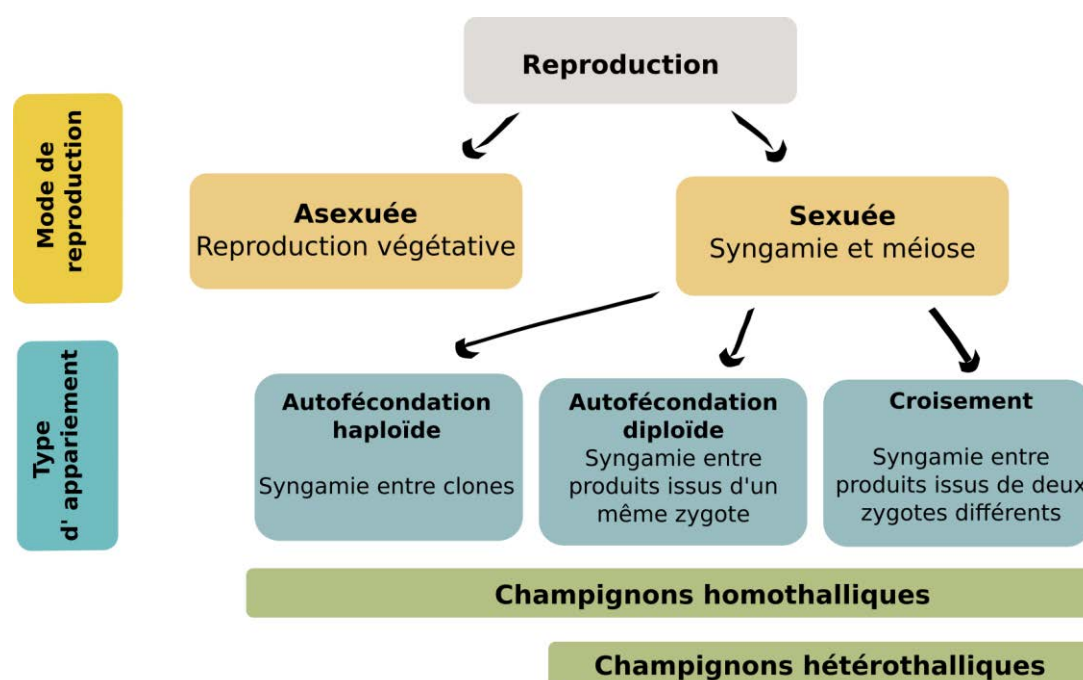


b- L'appariement sexuel

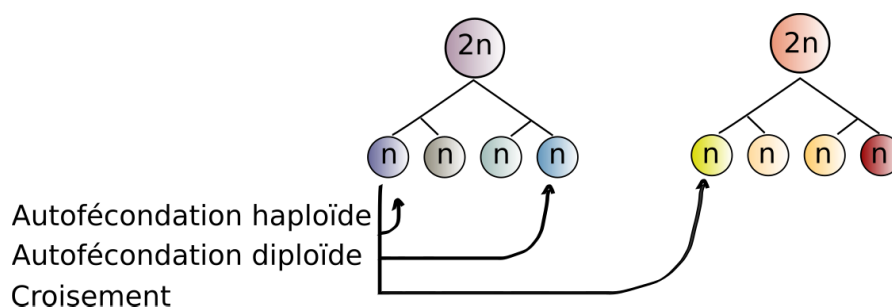
La fécondation peut s'effectuer soit par appariement de deux individus haploïdes différents, soit par autofécondation (**Fig. 7**). A l'instar d'autres groupes d'organismes, la fécondation chez les champignons n'implique pas toujours de différenciation anatomique (*e.g.* l'anisogamie différenciant les classes de gamètes par leur taille), bien que des différenciations existent chez certains ascomycètes (**Fig. 9**). Toutefois, chez les champignons hétérothalliques, il existe un système de régulation (**incompatibilité sexuelle**) permettant l'appariement uniquement entre individus génétiquement distincts, et donc excluant l'autogamie (aussi appelée homothallisme). L'incompatibilité sexuelle est moléculaire, et implique des gènes définissant les types-sexuels (*mating-type*, MT). Chez les Ascomycètes ces types-sexuels sont bipolaires, avec un locus à deux allèles [appelés des idiomorphes ; **Encadré 10**], alors qu'ils peuvent avoir de multiples allèles sur un ou deux locus chez de nombreuses espèces de Basidiomycètes (Billiard *et al.*, 2011 ; Kronstad & Staben, 1997). Dans le cas d'organismes où l'appariement s'effectue au stade haploïde, il est nécessaire de distinguer l'autofécondation haploïde, impliquant deux individus haploïdes génétiquement identiques issus d'un seul clone, de l'autofécondation diploïde, impliquant deux individus génétiquement proches, mais issus par méiose d'un même individu diploïde (**Fig. 7** ; Billiard *et al.*, 2012). Si l'hétérothallisme empêche l'autofécondation d'un haploïde, il n'empêche néanmoins pas l'autofécondation diploïde (Billiard *et al.*, 2011), car certaines spores issues d'un même zygote diploïde seront de types sexuels différents et donc interfécondes. Le niveau de brassage génétique qui en résulte est différent (avec une tendance à la consanguinité plus importante). Le **régime d'appariement** décrit la manière dont les gamètes s'assemblent, ou en d'autres termes, la distance génétique moyenne au sein des « couples » qui se forment. Son analyse est facilitée chez les Ascomycètes car les haploïdes existent séparément au stade végétatif. La génétique des populations permet de mieux comprendre cet aspect de la biologie intrinsèque des espèces [**Encadré 8**].

Figure 7. Schéma synthétique des différents modes de reproduction chez les champignons (a.) et des différents types d'appariements sexuels (b.) (schémas adaptés de Billiard *et al.*, 2012).

a.



b.



4.3 Reproduction de la Truffe : découvertes récentes et points non résolus

a- Facteurs induisant la fructification

Les facteurs induisant la reproduction sexuée de la Truffe ne sont pas connus, et de nombreux brûlés, pour lesquels la présence végétative de la Truffe a été vérifiée, restent non-producteurs. Des études en laboratoire sur des Ascomycètes unicellulaires et filamenteux ont mis en évidence l'importance de facteurs comme la modification du substrat (notamment la restriction en nutriments), de la luminosité, du pH et des conditions atmosphériques, induisant la reproduction soit végétative, soit sexuée (Debuchy *et al.*, 2010). Pour les champignons dont la fructification est visible à l'œil nu (les macromycètes), très peu d'études ont caractérisé les facteurs induisant la fructification, et il semblerait que des variations abruptes de disponibilité en eau et en nutriments, ainsi que de température puissent affecter le développement du mycélium, initiant la formation des fructifications (Oei, 2003 ; Kües & Liu, 2000). Pacioni *et al.* (2014) ont montré que l'initiation des jeunes ascocarpes chez la Truffe est favorisée par un stress hydrique et que leur formation est précédée par une intense activité du mycélium (mesurée par émission de CO₂). De manière générale, il semblerait qu'un stress hydrique modéré soit bénéfique au développement végétatif de la Truffe (taux de mycorhization ; Olivera *et al.*, 2014), ce qui indique que l'irrigation doit être menée avec parcimonie pour favoriser l'entretien des truffières.

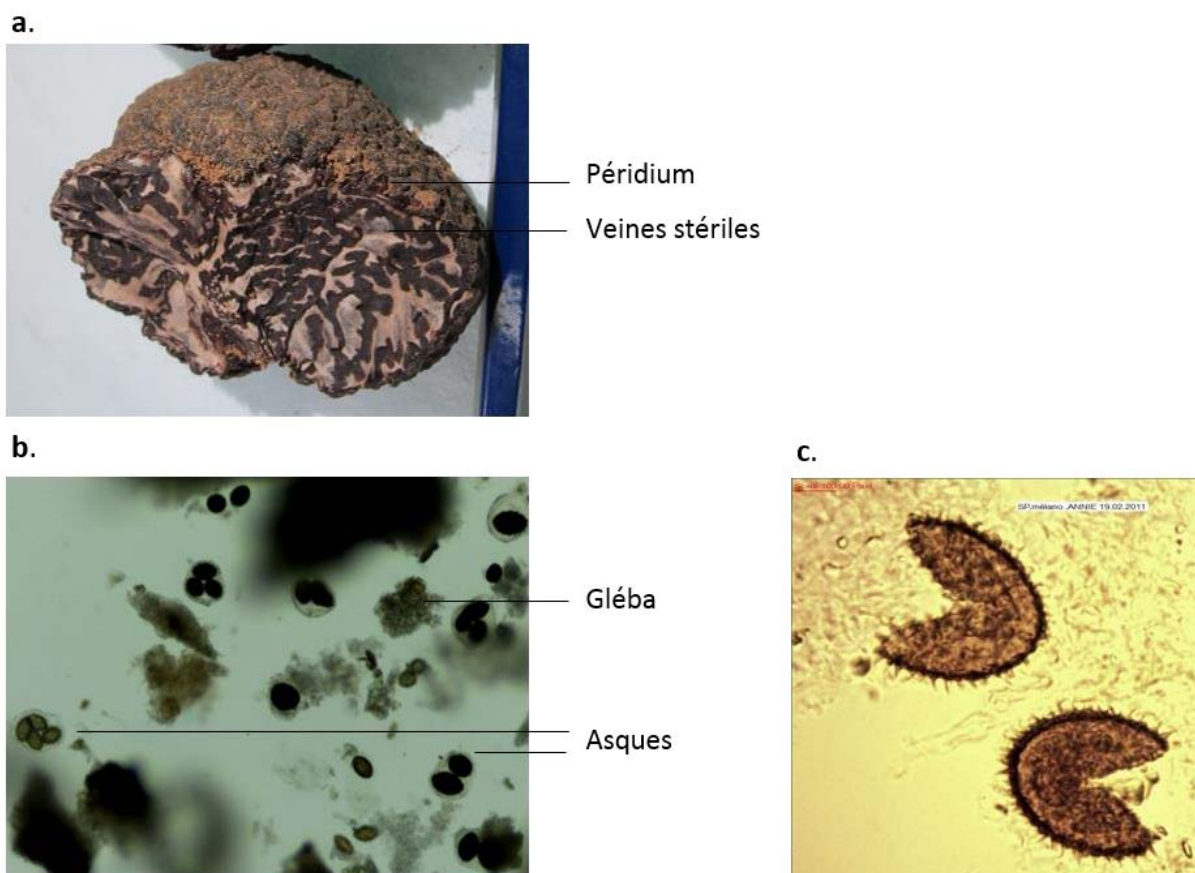
b- Formation de l'ascocarpe & mode de reproduction de la Truffe

Comme typiquement chez les Ascomycètes (**Fig. 6**), les ectomycorhizes de Truffe sont formées par le mycélium haploïde (Rubini *et al.*, 2014). Lors de la reproduction, les génets présents localement au niveau des ectomycorhizes vont jouer le rôle de l'individu maternel, formant la gléba, chair stérile des ascocarpes (Rubini *et al.*, 2011b) à la nutrition desquels ils participent (**Fig. 9**). Une expérience de marquage isotopique de CO₂ a en effet permis de suivre le carbone issu de la photosynthèse de l'arbre hôte, mettant en évidence que la nutrition carbonée de l'ascocarpe provient de l'arbre en transitant par les ectomycorhizes, liés à l'ascocarpe par des liens encore non observés (Le Tacon *et al.*, 2013). La source d'autres composés (azote, phosphate, *etc.*) n'a pas pu être identifiée par cette technique, mais ils pourraient être absorbés directement dans le sol par les houppes mycélienne de la Truffe (Barry *et al.*, 1994) et/ ou impliquer des bactéries, notamment fixatrices d'azote, de l'ordre des Bradyrhizobiaceae (Antony-Babu *et al.*, 2014 ; pour *T. magnatum*, Barbieri *et al.*, 2010).

Englobé par la gléba, l'ascocarpe contient des milliers de spores fortement mélanisées (**Fig. 8**), ainsi rendues résistantes à un passage dans un tube digestif (Piattoni *et al.*, 2014). Il est établi que ces spores résultent de reproduction sexuée hétérothallique (Rubini *et al.*, 2011b), alors que la Truffe avait longtemps été considérée comme homothallique. Cette hypothèse avait été avancée à cause de

l'absence d'hétérozygotie observée lors d'une des premières études utilisant des marqueurs génétiques codominants (deux **marqueurs microsatellites** permettant de détecter des allèles différents, c'est-à-dire des hétérozygoties [Encadré 8]; Bertault *et al.*, 2001). La présence d'hétérozygotie aurait alors ouvert l'hypothèse d'un croisement entre deux individus chez cette espèce haploïde. Cependant, il est vraisemblable que seul l'ADN de la gléba avait été extrait et/ou les deux marqueurs microsatellites utilisés étaient trop peu polymorphes (porteurs de peu de variabilité génétique). Quelques années plus tard, le séquençage du génome de la Truffe (souche haploïde Mel28 ; Martin *et al.*, 2010) a révélé la présence d'un allèle de type sexuel (MAT 1-2-1, abrégé en MT2 pour la suite) caractéristique d'hétérothallisme [Encadré 10]. La séquence du type sexuel opposé, MAT 1-1 (abrégé en MT1), a pu ensuite être identifiée (Rubini *et al.*, 2011b). La Truffe est donc un champignon hétérothallique, comme le confirme la présence des deux types sexuels au sein des ascocarpes lorsque que l'ADN des spores est extrait par un procédé spécifique (Paolocci *et al.*, 2006), qui 1) concentre les ascospores et 2) rompt les asques et la paroi des spores (Fig. 8). Ainsi, le génotype maternel est identifié en travaillant sur l'ADN de la gléba, et celui du père peut être déduit en soustrayant le génotype maternel à celui du zygote, obtenu en travaillant sur l'ADN des spores. Cette particularité de la Truffe en fait un modèle biologique fongique original, car les génotypes parentaux ne peuvent pas être atteints directement chez d'autres espèces.

Figure 8. a. Ascocarpe de Truffe (*T. melanosporum*) ouvert en deux (a.) et broyat d'un échantillon de cet ascocarpe avec présence de fragments de gléba avant isolement des asques (grossissement x 100 ; M. Sauve, b.) et spores isolées et éclatées (grossissement x 400 ; A. Guillen, c.).



c- Ségrégation spatiale des types sexuels

Les deux premières études cartographiant les génotypes présents sur des brûlés indiquent que plusieurs génotypes peuvent coexister autour d'un même arbre, partageant curieusement souvent le même type sexuel (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013). Les types sexuels sont donc distribués en plages homogènes dans les populations. Lorsque de jeunes plants sont inoculés par un broyat de plusieurs truffes (avec des spores des deux types sexuels), les ECMs sont formées par des génotypes haploïdes des deux types sexuels. Mais après plusieurs mois, l'un des types sexuels prend le dessus (Rubini *et al.*, 2011a). Etant donné que la fructification nécessite la rencontre des deux types sexuels opposés, ces observations ont été interprétées comme un élément possiblement limitant pour la production d'ascocarpes (Rubini *et al.*, 2014 ; Zampieri *et al.*, 2012 ; Murat *et al.*, 2013), mais cela nécessite de plus amples études ; de plus, la distribution agrégée des types sexuels, observés visuellement (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013), reste encore à être vérifiée par des analyses statistiques spatiales (**Chapitre III, Article 4**). Les mécanismes impliqués, comme des incompatibilités végétatives qui seraient liées au type sexuel, ainsi que les processus évolutifs en cause restent spéculatifs et sont discutés dans le **troisième chapitre** de cette thèse.

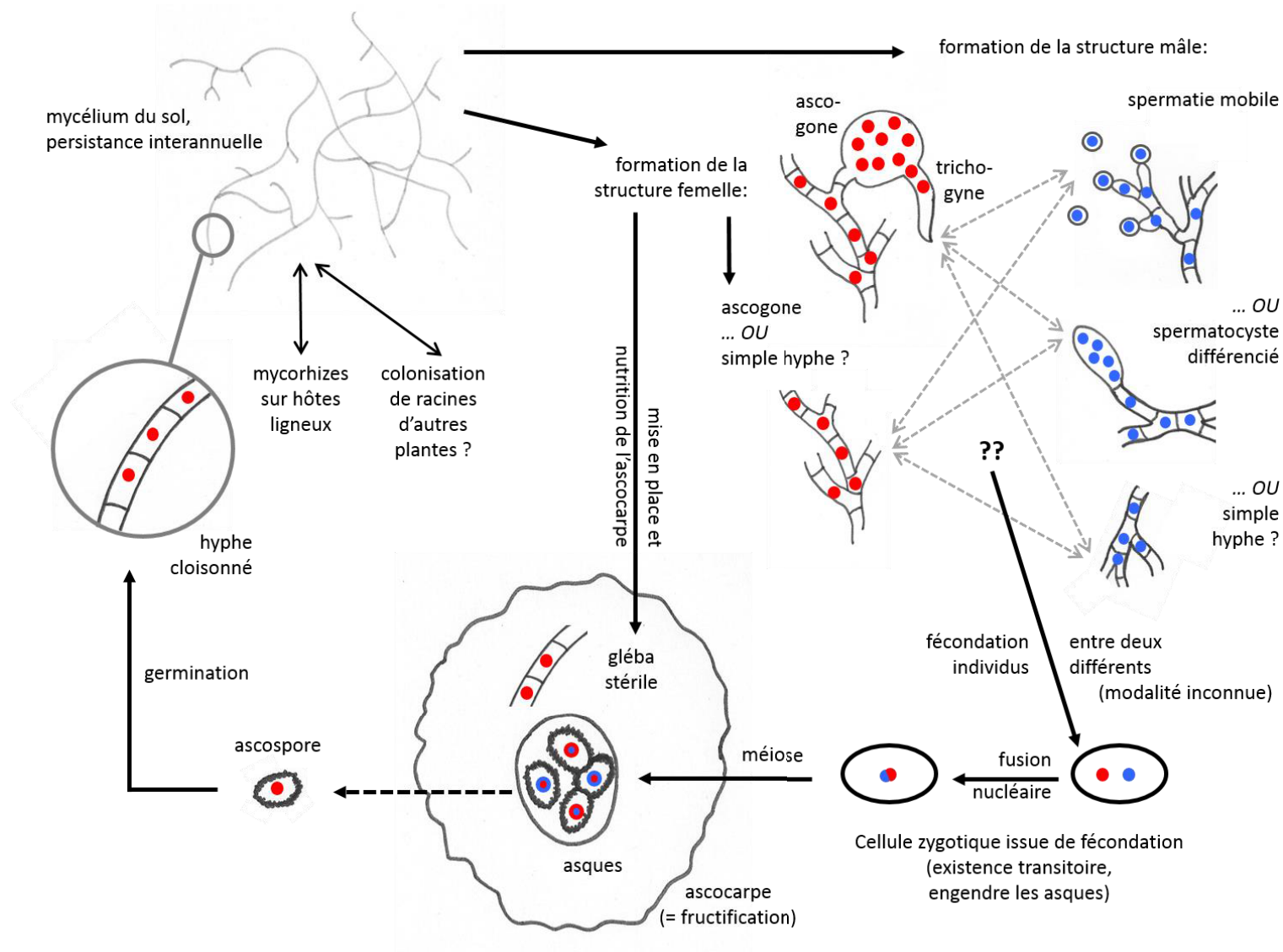
d- D'où viennent les génotypes paternels ?

Alors que les génotypes maternels sont présents localement au niveau des racines (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013), la provenance des gamètes paternels impliqués dans la reproduction reste inconnue (**Fig. 9**). Ces individus pourraient être présents localement, colonisant des supports qui n'ont pas été examinés jusqu'à présent. La présence de mycélium libre dans le sol est moins probable, du fait des capacités saprotrophes limitées de la Truffe (Martin & Bonito, 2012). La présence de spermaties dispersées par voie aérienne pourrait être une autre possibilité, récemment découverte chez de nombreuses espèces de l'ordre des Pézizales, dont des *Tuber* (Urban *et al.*, 2004 ; Healy *et al.*, 2013). Ces spermaties ne semblent pas germer en un mycélium libre, ce qui renforce l'hypothèse de leur rôle gamétique. Leur existence n'a cependant jamais été observée chez *T. melanosporum* (**Fig. 9**).

e- Structure des populations et la main de l'homme

Il est communément considéré que la Truffe, champignon hypogé, disperse ses spores principalement par endozoochorie (passage dans le tube digestif d'animaux mycophages), mais il est possible qu'une dispersion aérienne de spermaties (Urban *et al.*, 2004 ; Healy *et al.*, 2013) contribue à la dispersion génétique. La question d'un éventuel flux génétique lié au déplacement des gamètes mâles a été abordée par l'analyse de la structure génétique des populations de Truffes à différentes échelles dans l'**Article 4 (Chapitre III)**. De plus, la structure des populations présentes sur les brûlés des truffières spontanées n'a jamais été décrite de façon exhaustive et il est probable que l'utilisation de plants inoculés par un broyat composé de nombreuses truffes modifie cette structure. Au-delà de potentielles différences liées à l'inoculum initial, il est probable que des pratiques culturales telles le travail du sol et le réensemencement (**Fig. 5c**) intensifient la dispersion et augmentent la diversité des individus qui s'apparient. A plus vaste échelle, il est possible que la diversité génétique soit globalement appauvrie et surtout homogénéisée spatialement du fait de l'utilisation de plants inoculés issus de quelques grandes pépinières, au moins en truffières plantées. L'impact du phénomène de proto-domestication sur la structure génétique des populations de Truffes n'a jamais été étudié. L'**Article 4 (Chapitre III)** proposera une première comparaison des truffières spontanées et plantées.

Figure 9. Cycle de la Truffe illustrant les différents mécanismes biologiques possibles impliqués dans la reproduction, inspirés d'autres cycles d'Ascomycètes (schéma repris de M.-A. Selosse, non publié).



Encadré 10 : Gènes des types sexuels et différenciation sexuelle.

Chez les champignons, la reproduction est orchestrée par les gènes du type sexuel (*mating-type*). Les mycéliums portant des allèles différents pour ce(s) gène(s) sont inter-fertiles. Chez les ascomycètes, il existe deux formes alternatives à un locus qualifiées d'idiomorphes car ce sont de longues régions non-recombinantes, riches en éléments transposables rendant chaque idiomorphe différent, non-alignable et non-recombinable à l'autre. MAT 1-1 encode une protéine à motif α -box tandis que MAT 1-2-1 encode une protéine à motif "HMG-box" (« *High Mobility Group* ») ; d'autres gènes peuvent exister à ce locus. Les gènes du type sexuel sont impliqués dans la reconnaissance entre cellules de types sexuels opposés (par un contrôle du système de phéromones et récepteurs) et peuvent participer au développement des structures de reproduction différenciées, par exemple l'ascogone et le trichogyne chez certains ascomycètes dont la croissance est dirigée par les phéromones (**Fig.9**) ; Kim & Borkovich, 2006. Alors que chez les espèces homothalliques (= autogames) les deux idiomorphes sont généralement présents chez un même individu (avec des exceptions impliquant d'autres mécanismes ; Coppin *et al.*, 1997), les espèces hétérothalliques ne portent qu'un seul de ces gènes par génome haploïde et nécessitent la rencontre du type sexuel opposé pour la reproduction.

Chez certains ascomycètes existe une différenciation sexuelle, avec des structures donneuses *versus* receveuses de noyaux fécondants : le zygote se développe alors sur la partie receveuse, qui investit donc plus que la partie donneuse (ce sont donc respectivement les fonctions mâle *versus* femelle). Ces structures peuvent être portées par le même mycélium (hermaphrodisme) ou des mycéliums séparés (sexes séparés). Il faut noter que les types sexuels n'ont rien à voir avec ces différenciations, et ne sont en aucun cas une forme de sexes séparés cryptiques : bien au contraire, ils se superposent à la différenciation sexuelle. Ainsi, les truffes et de nombreux autres pézizomycètes sont des hermaphrodites où l'existence de types sexuels interdit l'autogamie.

5 Objectifs, questions et principales étapes de travail

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre la place et la dynamique de la Truffe dans les écosystèmes où elle apparaît de façon spontanée, en s'intéressant à ses interactions avec les plantes et les champignons ECMs, ainsi que ses possibles interactions avec les plantes endo- ou non-mycorhiziennes avec lesquelles elle coexiste au sein des brûlés. De plus, il s'agit d'éclaircir les éléments fondamentaux du cycle biologique de l'espèce, et plus particulièrement ceux qui sont liés à sa reproduction sexuée. A l'heure où 80 % de la production de Truffe provient de plantations, dans lesquelles l'homme influence fortement le milieu, il paraît nécessaire de mieux appréhender les possibles conséquences des itinéraires truffiers cultivés sur la structure et la diversité génétique des populations de ce champignon hautement apprécié, en comparaison de la dynamique et de la diversité du compartiment spontané. Nos analyses se sont en grandes parties concentrées sur les truffières en région Languedoc-Roussillon, incluant quelques sites en régions limitrophes (**Fig. 10**). Les différents aspects cités ci-dessus ont été abordés à travers trois chapitres, qui traitent des questions suivantes :

- 1) Quelle est la diversité et la dynamique des communautés ectomycorhiziennes des truffières spontanées ?

Dans ces milieux de successions secondaires coexistent plusieurs espèces de plantes ECMs, toutes hôtes potentiels de la Truffe. Dans les piémonts pyrénéens (truffière de Pierre Bernadach, aimablement mise à notre disposition pour cette thèse), nous avons analysé les structures des communautés ECMs des quatre principales plantes ECMs de ce milieu (*Quercus ilex*, *Q. coccifera*, *Cistus albidus*, *Arbutus unedo*), échantillonnés selon une chronoséquence incluant des brûlés à trois stades différents d'évolution (venant d'apparaître, producteurs, ou ayant cessé de produire) dans le but 1) d'analyser la place (abondance, partenaires) qu'y occupe la Truffe, 2) de suivre la dynamique des communautés fongiques ECMs au cours de l'évolution des brûlés et 3) d'évaluer la proportion d'espèces ECMs partagées entre les quatre plantes hôtes.

➔ Chapitre I, Article n°1.

- 2) Quelles sont les interactions entre la Truffe et les plantes AM communément présentes dans les truffières ?

Un large échantillonnage d'espèces de plantes AM communément présentes dans les truffières a été effectué pour vérifier à l'aide de sonde moléculaire spécifique (amorces PCR) si la Truffe en colonise les racines. Puis, afin d'identifier la diversité des génets présents sur les racines à l'échelle d'un brûlé ainsi que leur potentielle implication dans la reproduction, un sous-échantillonnage de génets endophytes a été intégré à l'analyse de la structure génétique des populations de Truffe.

➔ Chapitre III, Article n°3.

Par une expérience *ex-situ*, nous avons cherché à quantifier et à qualifier les interactions réciproques entre la Truffe, son hôte ECM privilégié (*Q. ilex*), et six espèces de plantes AM sélectionnées sur la base des connaissances empiriques des trufficulteurs, dans le but d'évaluer 1) l'existence de plantes qui favorisent le développement végétatif de la Truffe, 2) l'impact de la Truffe sur le développement de son hôte et des plantes AM et 3) les potentielles interactions plantes-plantes médiées par ce champignon.

→ Chapitre II, Article n°2.

3) Quel est la structure génétique des populations des truffières spontanées et cultivées?

Nous discuterons dans une première partie les mécanismes biologiques et évolutifs potentiellement impliqués dans la ségrégation végétative des types sexuels et plus généralement du processus de proto-domestication de la Truffe.

→ Chapitre III, Article n°3.

Et deuxièmement, dans le but de mieux comprendre 1) les mécanismes de dispersion, 2) l'appariement et la provenance des génotypes paternels, 3) la répartition des types sexuels, 4) les modifications possiblement induites par les pratiques culturales sur les points 1 à 3, ainsi que 5) la diversité génétique globale des compartiments spontanés et cultivés, nous avons analysé la structure génétique des populations de Truffe. Nous avons réalisé cette étude à l'échelle du brûlé, de la parcelle (= truffière) et de la région Languedoc-Roussillon, en incluant des individus végétatifs haploïdes (les ectomycorhizes et racines AM) et l'analyse des zygotes issus de fécondation (les ascocarpes).

→ Chapitre III, Article n°4.

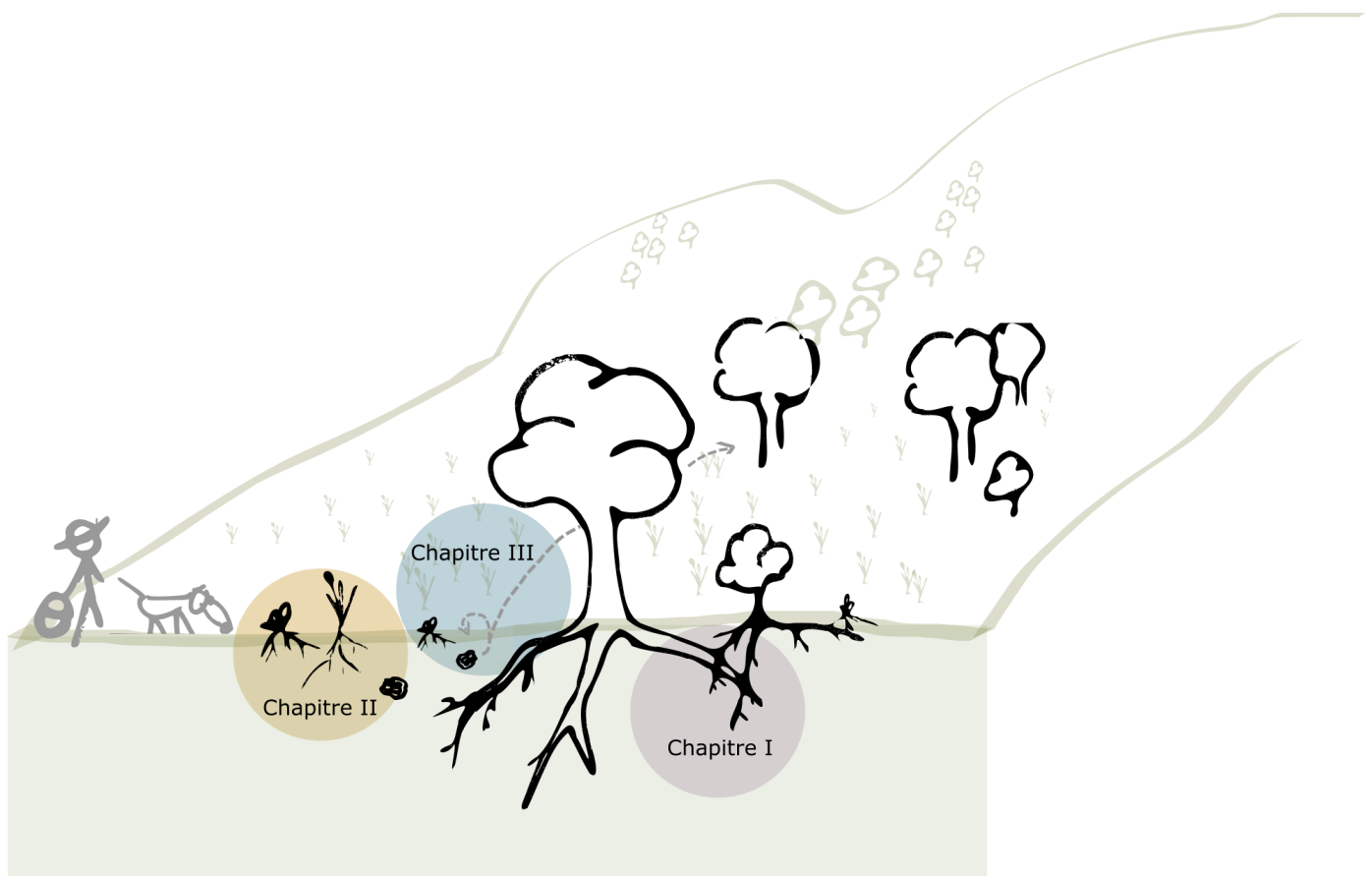
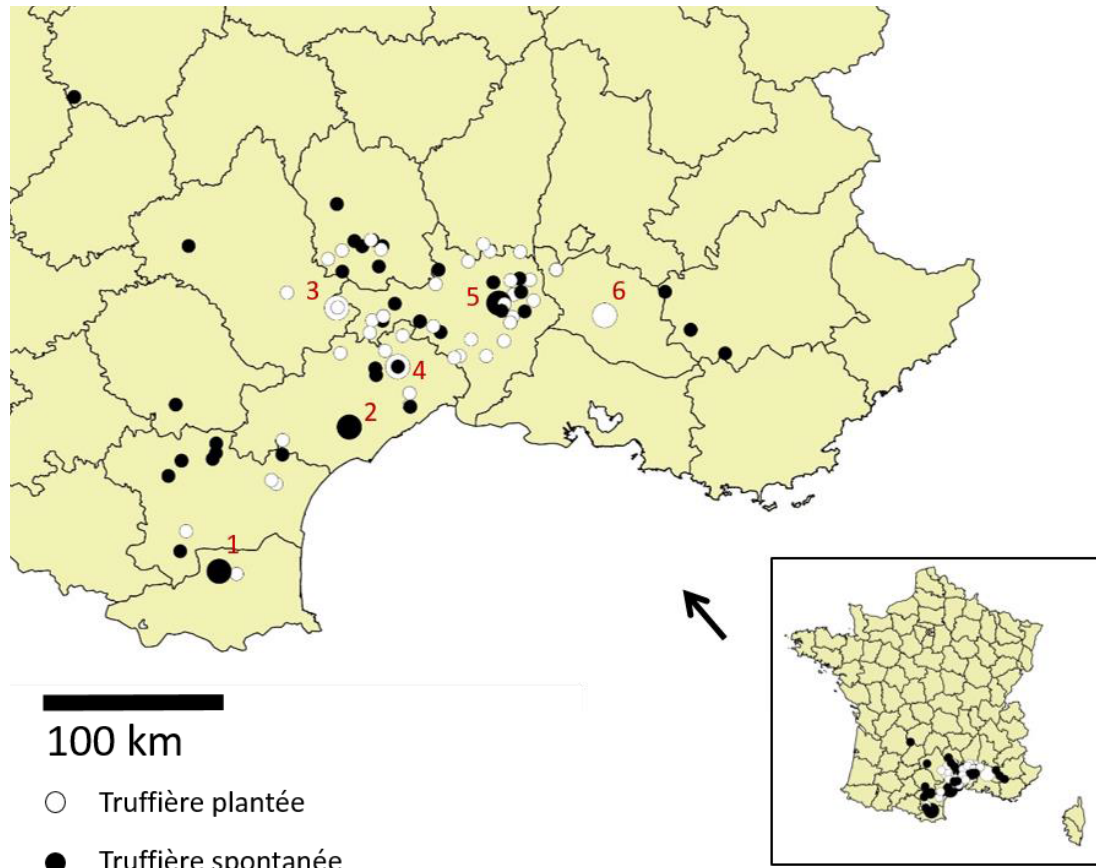


Figure 10. Carte des sites d'échantillonnages, avec un focus sur la principale zone d'échantillonnage (Languedoc-Roussillon), précisant le type de truffière (spontanée ou plantée). Les gros points localisent nos principaux sites d'échantillonnages (voir détails dans la légende) et les petits points correspondent aux échantillons de truffes utilisées dans l'analyse de la diversité génétique globale à l'échelle régionale (**Article 4**).



Principaux sites d'échantillonnages

- 1 **Article 1:** Analyse des communautés ectomycorhiziennes.
Article 2: Prélèvement de sol pour l'expérience en mésocosmes.
Article 4: Suivi d'un brûlé spontané durant 4 saisons (SB1), échantillonnage d'ectomycorhizes de Truffe et de racines de plantes AM.
- 2 **Article 4:** Suivi d'un brûlé spontané durant 4 saisons (SB2), échantillonnage d'ectomycorhizes de Truffe et de racines de plantes AM.
- 3 **Article 4:** Suivi des fructifications sur deux brûlés plantés durant 4 saisons (PB1, PB2), échantillonnage d'ectomycorhizes de Truffe.
- 4 **Article 4:** Suivi des fructifications d'une parcelle plantée durant 3 saisons (PG1), effectué par Bertault *et al.* (2001), et échantillonnage de racines de plantes AM.
- 5 **Article 4:** Suivi des fructifications d'une parcelle spontanée durant 2 saisons (SG1).
- 6 **Article 4:** Suivi des fructifications d'une parcelle spontanée durant 2 saisons (SG2).

Chapitre I **Communautés ectomycorhiziennes des brûlés spontanés**

Diversité, partage dans l'espace et dynamique dans le temps des communautés ectomycorhiziennes au cours du développement de brûlés spontanés de *T. melanosporum*.

Article 1: « *Whose truffle is this? Distribution patterns of ECM fungal diversity in Tuber melanosporum brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities.* »

Accepté dans *Environmental Microbiology*, Août 2014.

Résumé en français

Dans cette analyse, nous nous sommes intéressés à la structure des communautés ectomycorhiziennes (ECMs) dans les brûlés de *Tuber melanosporum* déclarés de façon spontanée dans des communautés végétales typiques des pré-bois méditerranéens. Ces végétations transitoires, héritées de l'abandon agro-sylvo-pastoral, sont plurispécifiques et plusieurs espèces ECMs arbustives y co-dominent pendant quelques décennies. Paradoxalement, la distribution (présence et fréquence) de la Truffe sur ces différents hôtes potentiels présents dans la plupart des truffières dites spontanées, ainsi que la dynamique des communautés ECMs dans le sol au cours de l'évolution des brûlés spontanés, de leur apparition jusqu'à leur sénescence, n'ont jamais été étudiés.

Dans ce travail, un échantillonnage de 192 carottes de sol a été effectué dans les Pyrénées-Orientales (Pézilla-de-Conflent). Des ectomycorhizes de chêne vert (*Quercus ilex*), de chêne kermès (*Q. coccifera*), d'arbousier (*Arbutus unedo*) et de ciste cotonneux (*Cistus albidus*) ont été prélevées de manière synchrone dans trois stades successifs de l'évolution des brûlés ainsi qu'en futaie fermée. Au total, 39 brûlés et 6 points contrôles en futaie âgée ont été analysés sur cinq sites. Pour 522 ectomycorhizes, les deux partenaires (c'est-à-dire l'espèce fongique et l'hôte végétal) ont été identifiés, par séquençage de l'ITS fongique (code-barre moléculaire) et par analyse de profils de restriction enzymatique de l'ADN de l'hôte (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). La composition des communautés ECMs a ensuite été comparée entre espèces végétales (taux de partage) et entre stades successifs d'évolution du brûlé. De plus, la quantité de mycélium de truffe dans le sol a été comparée entre les différents stades : les prélèvements de sol ont fait l'objet d'une analyse stratifiée de leur teneur en mycélium de truffe par PCR quantitative, en collaboration avec J. Parladé (IRTA, Cabrils, Espagne).

Le séquençage des ectomycorhizes a révélé 151 OTUs (≈ espèces moléculaires) de champignons ECMs sur l'ensemble des stades dynamiques explorés. L'analyse moléculaire couplée hôte/symbionte a mis en évidence une différence marquée entre la distribution des canopées et celle des systèmes racinaires : la composition racinaire dans les horizons organiques du sol ne constitue pas une projection verticale de celle des frondes arbustives et arborescentes. Ainsi, dans les carottes de sol prélevées sous les frondaisons du chêne kermès, 20% seulement des mycorhizes échantillonnées appartenaient à cet hôte. L'identification couplée hôte/symbionte se révèle ainsi fondamentale dans ce type de mosaïque végétale.

Nos résultats montrent que la Truffe (*T. melanosporum*) est présente dans des communautés ECMs riches en espèces, principalement composées d'espèces rares (**Fig. 11, ci-dessous**), et dominées en richesse et en abondance par des Thelephoraceae et des Pyrenomataceae (**Table 2** de l'article). Des ectomycorhizes de Truffe ont été trouvées sur un seul des 13 brûlés immatures, ainsi que sur cinq des 14 brûlés producteurs et sur aucun des 12 brûlés post-producteurs. Dans les brûlés producteurs, la Truffe est ainsi la seconde espèce par l'abondance relative (**Fig. 11, ci-dessous**). Cependant, elle ne semble pas persister sur les stades suivants (brûlés post-producteurs et forêt fermée), alors que les

quatre autres espèces du genre *Tuber* identifiées persistent (**Table 4 de l'article**). De plus, alors que les quatre autres espèces de *Tuber* ont été trouvées sur au moins deux hôtes chacune, la Truffe n'a été détectée que sur le chêne vert (**Fig. 11, ci-dessous & Table 4 de l'article**). Ces résultats suggèrent une relative fugacité de la Truffe dans les écosystèmes analysés, liée à une écologie plus marquée que d'autres espèces du genre *Tuber*, à la fois en termes de préférence d'hôte et d'exigences ou de capacités écologiques.

Au niveau du mycélium dans le sol, l'analyse quantitative révèle une forte variabilité de concentration entre brûlés d'un même stade. Ainsi, les concentrations mesurées sont de faible valeur prédictive quant au stade d'évolution (et donc de production) du brûlé. Néanmoins, les plus fortes concentrations ont été mesurées sur des brûlés producteurs, montrant ainsi que l'abondance et la distribution des structures végétatives (ectomycorhizes et mycélium) ne reflètent que partiellement la production d'ascocarpes.

De façon plus globale, dans ces successions secondaires jusqu'alors peu étudiées, de nombreuses OTUs fongiques sont partagées entre plusieurs hôtes (**Fig. 2 A de l'article**), sans qu'il n'y ait de lien entre la proximité phylogénétique des espèces de plantes et le niveau de partage. Ainsi, les deux espèces de chênes ne partagent pas plus d'espèces fongiques entre elles qu'elles n'en partagent avec les autres espèces plus éloignées phylogénétiquement (**Fig. 1 de l'article**). La communauté propre au chêne vert englobe plus de 60% des OTUs trouvées sur chacun des autres hôtes, un pourcentage bien supérieur à celui obtenu pour les trois autres espèces (**Fig. 1 C de l'article**). Le rôle de ce fort taux de partage d'espèces ECMs, et de son asymétrie entre les hôtes, restent à analyser, notamment dans le cadre de la dynamique rapide de recolonisation forestière après abandon agricole.

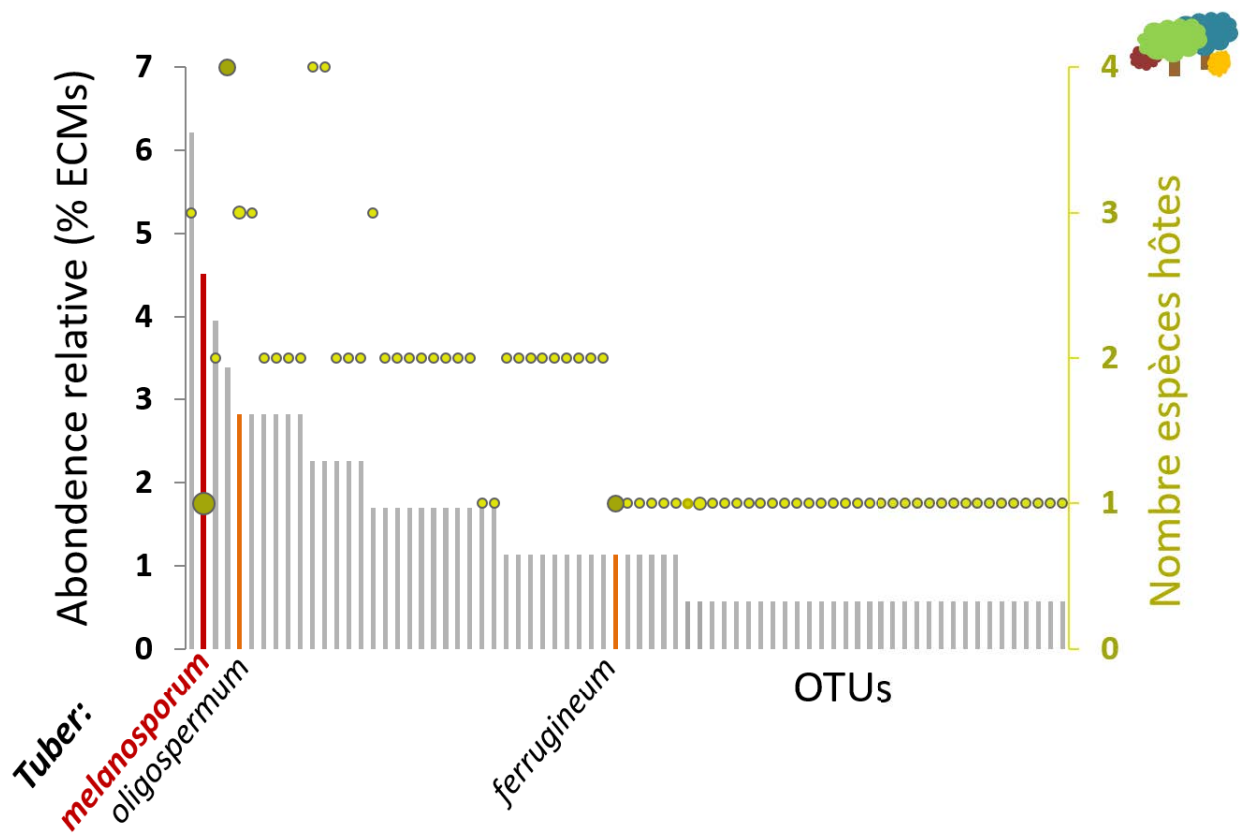


Figure 11. Communautés ECMs sur les brûlés au stade producteur, montrant l'abondance relative des OTUs présentes (histogramme, axe de gauche) et le nombre d'espèces hôtes de chaque OTU (points verts, axe de droite). *Tuber melanosporum* est indiquée en rouge, et les deux autres espèces de *Tuber* présentes à ce stade en orange.

Article 1

Whose truffle is this? Distribution patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities

Elisa Taschen,^{1*} Mathieu Sauve,¹ Adrien Taudière,¹ Javier Parlade,² Marc-André Selosse³ and Franck Richard¹

¹UMR 5175, CEFE, CNRS – Université de Montpellier – Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE – 1919 route de Mende, Montpellier 34293, France.

²Sustainable Plant Protection, IRTA, Centre de Cabriels, Ctra. Cabriels km. 2, Cabriels, Barcelona 08348, Spain.

³Département Systématique et Evolution (UMR 7205 ISYEB), Muséum National d'Histoire Naturelle, CP 50, 45 rue Buffon, Paris 75005, France.

Summary

In the Mediterranean region, patches of vegetation recovering from disturbance and transiently dominated by shrubs produce one of the world's most prized fungi, the black truffle (*Tuber melanosporum*). In these successional plant communities, we have fragmentary knowledge of the distribution of *T. melanosporum* in space among ectomycorrhizal (ECM) host species and in time.

Molecular identification of hosts (Restriction Fragment Length Polymorphism) and fungi (Internal Transcribed Spacer sequencing) and quantification of *T. melanosporum* mycelium (quantitative Polymerase Chain Reaction) were employed to evaluate the presence of *T. melanosporum* on four dominant ECM host species (*Quercus ilex*, *Quercus coccifera*, *Arbutus unedo*, *Cistus albidus*) and the extent to which their respective ECM communities shared fungal diversity, over the course of development of truffle grounds, from recent unproductive brûlés to senescent ones where production has stopped.

We found that truffle grounds host rich communities in which multi-host fungal species dominate in frequency. When considering both ECM tips and soil mycelia, we documented a dynamic and spatially

heterogeneous pattern of *T. melanosporum* distribution in soils and a presence of ECM tips restricted to *Q. ilex* roots.

This study advances our knowledge of the ecology of *T. melanosporum*, and provides insight into the extent of ECM fungal sharing among plant species that dominate Mediterranean landscapes.

Introduction

Identifying the factors driving the distribution of the astonishing diversity of fungi is a major challenge in microbial ecology. During the last two decades, mycologists have chiefly focused their attention on forest ecosystems (i.e. dominated by trees), largely neglecting the large expanses of shrub-dominated vegetation in Mediterranean regions. During secondary successions, these vegetation types typically occupy the land in most of the period between agricultural abandonment and establishment of forest. This especially applies in Mediterranean shrub-dominated vegetation, which comprises millions of hectares of species-poor plant communities, whose composition, and whose common names (e.g. macchia, garrigues, etc.), vary across the region (Grove and Rackham, 2003; Sirami *et al.*, 2010). These vegetation types are functionally crucial because the establishment of most Mediterranean tree species is often facilitated by shrubs, which buffer abiotic conditions in stress-prone environments (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004; Holmgren *et al.*, 2012) and play roles in positive plant–plant interactions mediated by microorganisms (Selosse *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2012).

Mediterranean tree species associate with particularly diversified communities of ectomycorrhizal (ECM) fungi that are involved in plant nutrition (Smith and Read, 2008) and tolerance to water stress (Kipfer *et al.*, 2012). Ectomycorrhizal fungal species vary widely in their ability to associate with different plant species, from being highly specific to having multiple hosts (Bruns *et al.*, 2002; Bingham and Simard, 2011). The capacity to have multiple hosts makes it possible for coexisting individuals of different plant species to share ECM fungal mycelia

Received 6 August, 2014; revised 1 December, 2014; accepted 2 December, 2014. *For correspondence. E-mail elisa.taschen@cefe.cnrs.fr; Tel. +33 (0) 4 67 61 32 31.

and indirectly interact (Bingham and Simard, 2011; Simard *et al.*, 2012). In the French Mediterranean region, only a few shrub species (e.g. species of *Cistus*, *Helianthemum*, *Arbutus*) have the ability to host ECM fungi on their roots (Richard *et al.*, 2009), while others (e.g. species of *Phillyrea*, *Pistacia*) harbour arbuscular mycorrhizal fungi (Maremmanni *et al.*, 2003). When Mediterranean oaks (*Quercus ilex* and *Q. coccifera*) establish in such vegetation, multiple ectomycorrhizal shrub species transitorily coexist before the complete canopy closure that precedes shrub decline. In Mediterranean ecosystems, the extent to which fungal species are shared among ECM hosts has been documented at the forest stage (Richard *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2008) but remains largely unknown in shrub-dominated communities.

The highly prized black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.) naturally establishes and is typically collected in these transitory ecosystems, although cultivated truffle grounds with planted host trees are increasingly developed nowadays. This ascomycete is an ECM fungal species that non-specifically associates with various distantly related hosts in the Fagaceae (*Quercus*), Betulaceae (*Corylus*), Malvaceae (*Tilia*) (Callot, 1999) and Cistaceae (*Cistus*) (Wenkart *et al.*, 2001; Comandini *et al.*, 2006; García-Montero *et al.*, 2007) and may even form orchid mycorrhizae (Girlanda *et al.*, 2006). In soils of natural and cultivated truffle grounds, studies analyzing ECM fungal diversity, usually considering one single-host tree species, have shown that *T. melanosporum* is a component of diversified ECM fungal communities (Napoli *et al.*, 2010) dominated by Tuberaceae and Thelephoraceae (Belfiori *et al.*, 2012; De Miguel *et al.*, 2014). In natural truffle grounds, *T. melanosporum* fruits in vegetation mosaics that precede forest stage during secondary succession (Médail and Quézel, 2003). In the French Mediterranean region, natural truffle grounds typically consist of scattered holm oaks (*Quercus ilex* L.) surrounded by a few ECM shrub species (Médail and Quézel, 2003). In these dynamic plant communities, the presence of *T. melanosporum* on roots of the different coexisting ECM hosts, its abundance and/or frequency within the fungal ECM communities on the roots and more broadly the distribution of the different components of this ECM community among co-occurring ECM host species have never been documented.

The vegetative presence of *T. melanosporum* is revealed by the occurrence of patches (called *brûlés*) of poorly productive vegetation neighbouring truffle host trees. The mechanisms underlying the formation of the *brûlé* are not fully understood (Streiblová *et al.*, 2012) and may include a lifestyle in which *T. melanosporum* parasitizes herbaceous plants (Plattner and Hall, 1995) or plant–fungal interactions through volatile organic com-

pounds it emits (Splivallo *et al.*, 2009). However, in natural truffle grounds as well as in plantations, the presence of a *brûlé* does not systematically indicate the production of *T. melanosporum* ascocarps (Suz *et al.*, 2008). Indeed, *T. melanosporum* *brûlés* usually appear first, sometimes becoming productive only years or even decades later (Diette and Lauriac, 2004; Streiblová *et al.*, 2012), and eventually become sterile before disappearing, generally as the forest canopy closes. Studies have compared the composition of ECM fungal communities in productive and non-productive *T. melanosporum* *brûlés* (see De Miguel *et al.*, 2014 for a review), but the concomitant changes in soil ECM diversity that accompany the emergence, maturation and decline of *brûlés* remain unknown. In particular, relationships between *T. melanosporum* ascocarp production, mycorrhizal root tip frequency and mycelium abundance have never been analysed in natural truffle grounds.

Here, we analysed the patterns of ECM fungal communities and *T. melanosporum* distribution in natural *brûlés* at different stages of ascocarp production. More specifically, we described the ECM communities associated with four co-occurring ECM plant species (*Q. ilex*, *Q. coccifera*, *Arbutus unedo* and *Cistus albidus*) at three different production stages (a–c) defined by the status of the *brûlé* (immature, productive or post-productive) and in surrounding relict forest (d), using systematic molecular identification of both fungal and plant partners on ECM tips in soil. In addition, we assessed *T. melanosporum* mycelium distribution in the soil of the same sites using quantitative PCR. We addressed the following questions: (i) In these secondary successional landscapes, what part of the ECM fungal diversity is shared among coexisting hosts, and do multi-host fungal species dominate the communities? (ii) In *T. melanosporum* *brûlés*, do co-occurring ECM plant species host ECM communities that are distinct in composition, and do they differ in their ability to host *T. melanosporum*? (iii) Do different production stages differ in the composition of their ECM fungal communities? (iv) Do the frequency of ECM tips and the distribution patterns of *T. melanosporum* extraradical mycelia fit the fruiting patterns of *T. melanosporum* among *brûlés*?

Results

General description of the study system

In all, 797 ECM tips were sampled on four host species, *Quercus ilex*, *Q. coccifera*, *Cistus albidus* and *Arbutus unedo* (hereafter abbreviated *Qi*, *Qc*, *Ca* and *Au*, respectively) from 192 soil cores on 45 plots (Table 1). Plant and fungal ITS were successfully sequenced for 522 (65.5%) ECM tips, including 25 fungal ITS sequences generated with the basidiomycete-specific primer pair ITS1F-ITS4B.

Table 1. Sampling design and subsequent analyses.

Sites	Prod. stages	No. of plots	Sampled plants per species				Analyses	
			Au	Ca	Qc	Qi	ECM root tip identification	<i>T. mel.</i> mycelium in soil
S1	a	2	1	1		2	✓	✓
	b	2	2	1		2	✓	✓
	c	2	2	2		2	✓	✓
	d	1	1			1	✓	✓
S2	a	3	3	1	3	3	✓	✓
	b	3	3	3	3	3	✓	✓
	c	3	3	1	3	3	✓	✓
	d	1	1		1	1	✓	✓
S3	a	3		2	3		✓	✓
	b	3	1		3	3	✓	✓
	c	2	1	1	2	1	✓	✓
	d	4		1	4	1	✓	✓
S4	a	2		2	2		✓	
	b	3		3	3		✓	
	c	2		2	2		✓	
S5	a	3	3	2		3	✓	
	b	3	3			3	✓	
	c	3	3			3	✓	
5 sites		45	27	22	29	31	192 soil cores: 522 ECM tips	29 plots

Fungal ITS revealed 151 OTUs (Table 2) predominantly belonging to Basidiomycetes (70.2% of ECMs and 79.6% of OTUs). Among Basidiomycetes, Thelephoraceae was the most abundant (37.1% of ECM tips), frequent (63.2% of soil cores) and diverse (38.8% of OTUs) family (Table 2). The second most abundant family, Pyrenomataceae, accounted for 13.6% of ECM tips, 28.8% of soil cores and 9.9% of OTUs. Thelephoraceae

Table 2. Relative abundance (number of ECM tips as a percentage of the total number of ECM tips), frequency (number of soil cores as a percentage of the total number of soil cores) and richness (number of OTUs as a percentage of the total number of OTUs) of 12 dominant ECM taxa.

ECM taxa	Abundance (%)	Frequency (%) ^a	Richness (%) ^b
Thelephoraceae	37.1	63.4	38.8 (59)
Pyrenomataceae	13.6	28.8	9.9 (15)
Tuberaceae	8.4	19.4	3.9 (5)
Cortinariaceae	7.3	16.2	8.6 (8)
Inocybaceae	6.7	12.0	9.9 (15)
Sebacinales	6.1	12.6	5.9 (9)
Tricholomataceae	5.5	12.6	5.9 (9)
Helvellaceae	3.3	6.3	3.3 (5)
Russulaceae	3.1	5.8	2.6 (4)
Pezizaceae	1.5	3.7	1.3 (2)
Gloniaceae	1.3	3.7	0.7 (1)
Boletaceae	1.1	2.6	2.0 (3)
Others	5.0	9.9	7.2 (16)
Ascomycetes	30	55	20.5 (30)
Basidiomycetes	70	86	79.5 (121)

a. Percentages in this column do not add up to 100, as multiple OTUs were often present in a single soil core.

b. Values in brackets are numbers of OTUs.

and Pyrenomataceae dominated consistently across sites (data not shown), host species and production stages (Table 2; Fig. 1A and B). A small number of species accounted for a large proportion of all occurrences. Six OTUs (4%) represented 20% of the total number of ECM types, and these species were also the most frequent both in the soil core (present in nine to 18 soil cores out of the total number of cores) and at the site (data not shown). These few common species were accompanied by a much larger number of infrequent species, with 33.8% of OTUs represented by only one sequenced ECM tip.

In 98 soil cores (51%), 282 ECM tips (54% of the total number of ECM tips successfully examined) provided RFLP patterns that did not correspond to that of the above-ground canopy species present in the plot (Table S1). The proportion of ECM tips that did not correspond to the above-ground canopy species ranged from 19.8% under *Au* to 79.5% under *Qc* (Table S1).

Multi-scale patterns of ECM communities

The variance in the composition of ECM communities was poorly explained by among-site variation (PERMANOVA; $df = 4$; $P = 0.001$; $R^2 = 0.047$) and was more closely related to among-plot variation (PERMANOVA; $df = 41$; $P = 0.001$; $R^2 = 0.396$, Table 3). A second set of analyses showed weak but significant effects of plant species present either as the ECM tip host (as identified by ITS RFLP; $df = 3$; $P = 0.018$; $R^2 = 0.029$) or as above-ground canopy species ($df = 3$; $P = 0.001$; $R^2 = 0.036$), and of

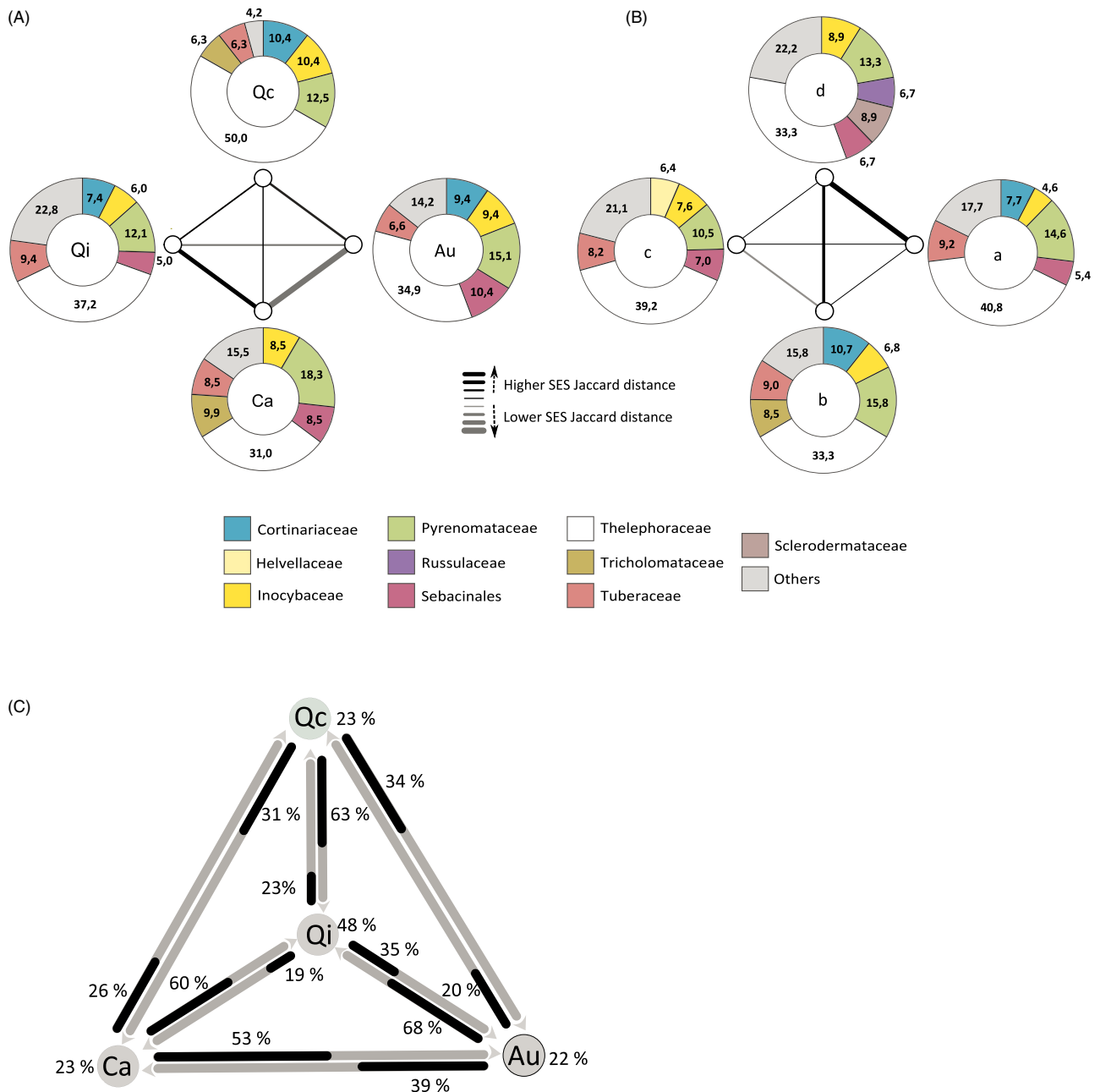


Fig. 1. Composition and similarities of ECM fungal communities among four host plant species (A) and four production stages (B), with detail of reciprocal sharing of OTUs between pairs of host species (C).

Host species are *Arbutus unedo* (Au), *Cistus albidus* (Ca), *Quercus ilex* (Qi) and *Q. coccifera* (Qc). Production stages are immature brûlés (a), productive brûlés (b), post-productive brûlés (c) and relict forests (d). The width of the links indicates the Standard Effective Size Jaccard distances between host plant species (A) and production stages (B), and the black/gray shade indicates whether they tend to be higher or lower, respectively, than the mean distance under the null model. None of these deviations from null expectations are significant.

(C) Reciprocal sharing of OTUs is expressed as the proportion of the OTUs associated with the focal species that is shared with the opposite host species indicated by the arrow. The proportion of OTUs specific to the focal host is indicated beside its name.

production stage (df = 3; $P = 0.002$; $R^2 = 0.031/P = 0.023$; $R^2 = 0.032$; Table 3b and c respectively) on variation in composition of ECM communities, but no significant interaction between plant species and production stage (Table 3).

Patterns of ECM communities across host species

When considering the four production stages together, each of the four host species showed patterns sharing three similarities: (i) unsaturated OTU accumulation

Table 3. Permutational multivariate analyses of variance (PERMANOVA) of ECM community composition according to a) scales of analysis, b) host species (*Arbutus unedo* versus *Cistus albidus* versus *Quercus ilex* versus *Q. coccifera*) and production stage (immature brûlés versus productive brûlés versus post-productive brûlés versus relict forests) and c) above-ground canopy species and the production stage (as above).

Source of variation		df	MS	R ²	P
a) Sampling scale	Site	4	4.607	0.047	0.001**
	Plot	41	3.765	0.396	0.001**
	Residuals	78	2.783	0.557	
	Total	123	0	1	
b) Host and stage	Host species	3	3.752	0.029	0.018*
	Production stage	3	4.04	0.031	0.002**
	Host sp. × prod. stage	9	2.374	0.055	1
	Residuals	109	3.167	0.885	
	Total	124	0	1	
c) Canopy and stage	Canopy species	3	4.539	0.036	0.001***
	Production stage	3	3.921	0.032	0.023*
	Canopy sp. × prod. stage	9	3.076	0.074	0.788
	Residuals	97	3.301	0.858	
	Total	112	0	1	

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.005$; *** $P \leq 0.001$.

curves (Fig. S1A); (ii) high OTU richness (32.5 to 35.4 OTUs per 45 ECM root tips; Table S2) and (iii) high values of the three diversity indices: the Shannon–Wiener information index (from 3.41 for *Qc* to 4.42 for *Qi*), Simpson's diversity index (from 0.96 for *Qc* to 0.98 for *Qi*) and Fisher's alpha (from 46.2 for *Ca* to 66.3 for *Qi*; Table S2). On each of the four host species, Thelephoraceae and Pyrenomataceae were the most represented families (Fig. 1A). The third families in terms of abundance depended on the host (Sebacinaceae on *Au*, 10.4% of identified ECM tips; Tricholomataceae on *Ca*, 9.9%; Cortinariaceae and Russulaceae on *Qc*, 10.4% each; Tuberaceae on *Qi*, 9.4%). According to SESJ-distances, the composition of ECM communities tended to be more similar between *Au* and *Ca*, and to a lesser extent between *Au* and *Qi*, but these distances did not significantly differ from those obtained under the null model (Fig. 1A).

Patterns of ECM communities across production stages

When considering the four host species together, production stages *a* (immature brûlé) and *c* (post-productive brûlé) showed the steepest species accumulation curves, while stage *b* (productive), and even more so stage *d* (relict forest), accumulated species more slowly (Fig. S1B). Similarly, production stage *a* showed the highest rarefied number of OTUs and values of Fisher's alpha, and stage *c* showed the highest Shannon–Wiener information index and Simpson diversity index, while stage *d* showed the lowest values for all indexes (Table S2).

Thelephoraceae and Pyrenomataceae dominated the ECM communities in each production stage, accounting for 55.4, 49.2, 49.7 and 46.7% of the identified ECM root

tips in stages *a*, *b*, *c* and *d* respectively (Fig. 2B). The third most represented ECM family on roots was Tuberaceae in stages *a* and *c* (9.2 and 8.2% respectively), Cortinariaceae in stage *b* (10.7%), and Inocybaceae and Sclerodermataceae in stage *d* (8.9% each; Fig. 1B). In the three different stages of brûlés (*a*, *b*, *c*), the same fungal families dominated the ECM communities (Fig. 2B). In the relict forest soils (stage *d*), the distribution pattern of ECM fungal families slightly differed from that in brûlés (*a*, *b*, *c*), with Sclerodermataceae and Russulaceae replacing Cortinariaceae and Tuberaceae among the eight most represented families.

According to SESJ-distances, the composition of ECM communities tended to be more similar between stages *b* and *c* than between all other pairs of productive stages, with a marked difference between stages *a* and *d* (Fig. 2A).

Plant host sharing by ECM fungi

Of the 151 ECM fungal OTUs, 84 (55.6%) were found on roots of one single host species (Fig. 2). Multi-host fungal species included 41 (27.2%), 21 (13.9%) and five (3.3%) OTUs shared by two, three and four host plant species respectively (Fig. 2). Fungal OTUs shared by all host species included two species from the Ascomycetes [*Genabea sphaerospora* (OTU 164) and *Tuber oligospermum* (OTU 147)] and three species from the Basidiomycetes [*Tricholoma scalpturatum* (OTU 155), *Inocybe tenebrosa* (OTU 43) and *Thelephoraceae* (OTU 86)].

A significant and positive correlation was found between the frequency of fungal OTUs and the number of their host species ($P < 0.001$ by Pearson's test; Fig. 2B).

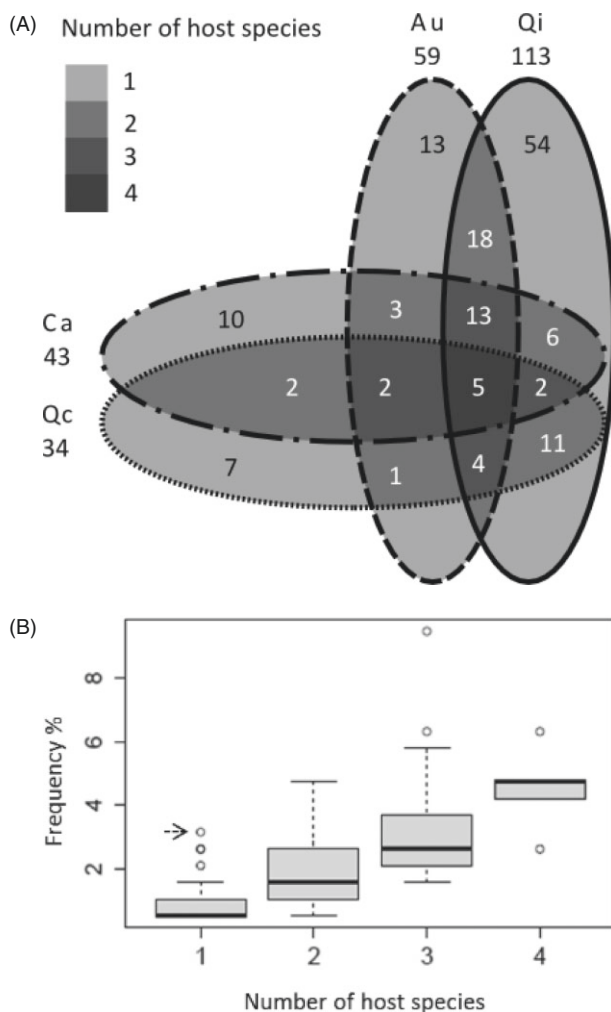


Fig. 2. A. Venn diagram representing the distribution of ECM fungal OTUs on *Arbutus unedo* (Au), *Cistus albidus* (Ca), *Quercus ilex* (Qi) and *Q. coccifera* (Qc) root tips. Shaded zones indicate the number of fungal OTUs found on roots of one, two, three and all four host species. B. Distribution of OTUs according to the number of their associated host species and their frequency in soil cores. The arrow indicates the location of *T. melanosporum*.

Accordingly, the five fungal OTUs present on four host species belonged to the eight most frequent OTUs on the roots of all host species.

Fungal sharing by host plant species

Of the total number of root tips examined, the proportion occupied by fungal OTUs that were shared with at least one other species ranged from 52.2% for Qi to 79.4% for Qc (Fig. 2A). Ca and Au showed similar patterns to Qc, with 76.7% and 78% of fungal OTUs shared with other host species (Fig. 1C). A bidirectional representation of symbiont sharing between host species showed a different pattern on Qi than on the three other host species: the proportion of OTUs of the ECM community of Qi also shared with other host species varied from 19% to 35% from the Qi side, while it represented 60%, 63% and 68% of OTUs, of the community of Ca, Qc and Au respectively (Fig. 2C).

Distribution patterns of Tuber species across host species and production stages

In all, five OTUs were assigned to Tuberaceae as defined by Bonito and colleagues (2010), including *Tuber ferrugineum* (OTU 146) and *Tuber sp.1* (OTU 149) in the rufum clade, *T. oligospermum* (OTU 147) and *T. borchii* (OTU 150) in the puberulum clade and *T. melanosporum* (OTU 148; Fig. S2).

The analysis of the distribution patterns of the five species of Tuberaceae across host species and production stages showed that (i) all species but *T. melanosporum* were shared by at least two host species; (ii) *T. melanosporum* was restricted to Qi; (iii) the five species of *Tuber* were present on only recently arisen brûlés (stage a); (iv) *Tuber ferrugineum* (Table 4) within the rufum clade (Fig. S2) was the only species present across the four production stages and in the relict forest and (v) *T. oligospermum* was the only species present on roots of all four host species (Table 4).

Table 4. Relative abundance of Tuberaceae species across production stages and host species. Abbreviations indicate the identity of species of Tuberaceae assigned as defined by Bonito and colleagues (2010): T. fer for *T. ferrugineum*; T. oli for *T. oligospermum*; T. bor for *T. borchii*; T. mel for *T. melanosporum* and T. sp1 for a species within the rufum clade. Shading indicates the cumulative abundance in percent of species of Tuberaceae per host per production stage (0–5%, 5–10%, 10–15%, > 15%).

Host species	Production stages			
	Immature brûlés	Productive brûlés	Post-productive brûlés	Relict forest
<i>A. unedo</i>	T. bor/T. oli	T. oli	T. oli/T. sp1	
<i>C. albidus</i>	T. oli/T. fer	T. oli	T. sp1	
<i>Q. coccifera</i>		T. oli	T. fer	
<i>Q. ilex</i>	T. bor/T. oli/T. mel/T. sp1	T. oli/T. mel/T. fer	T. bor/T. oli/T. fer	T. fer
Number of OTUs	5	3	4	1

Distribution patterns of *T. melanosporum* across host species and production stages

Root tips of *T. melanosporum* were found in one out of 13 recently arisen brûlés (stage *a*) and in five out of 14 productive brûlés (stage *b*), where it was the second most frequent species (4.25%) after OTU 33 (uncultured Pyrenomataceae). Based on comparison of its observed frequency (number of soil cores in which it was present) with that given by the null model, *T. melanosporum* was a significantly over-represented OTU among the single-host fungi ($P = 0.049$): according to its frequency, more than one associated host species would have been expected according to the null model. In other words, *T. melanosporum* is over-represented on *Qi* compared with the general distribution pattern of OTUs among host species according to their frequency, which indicates a particular host affinity of *T. melanosporum* for *Qi*.

The concentration of *T. melanosporum* mycelium in soil varied significantly across production stages and among plots of the same stage (Fig. 3). A Fligner–Killeen test showed a significantly over-dispersed distribution pattern across plots ($df = 3$; $\text{Chi}^2 = 10.45$; $P = 0.015$). The mycelium biomass was significantly higher in productive brûlés than in post-productive brûlés and relict forests ($P = 0.018$ and 0.028 by Wilcoxon test for *b* versus *c* and *b* versus *d* respectively).

The distribution patterns of *T. melanosporum* mycelia were consistent with patterns of root tip occurrence, the highest values of mycelium concentration corresponding to plots where *T. melanosporum* was also detected as root tips.

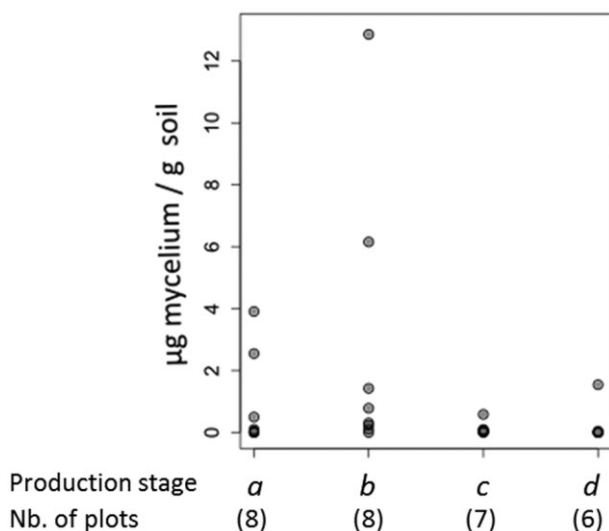


Fig. 3. Concentration of *T. melanosporum* mycelia in soils collected in immature brûlés (*a*), productive brûlés (*b*), post-productive brûlés (*c*) and relict forests (*d*) from sites 1, 2 and 3.

Discussion

Our study provides three main insights into the structure and dynamics of ECM fungal communities during ecological succession in Mediterranean regions. First, before canopy closure, shrubs and trees harbour multi-host fungi within species-rich and highly connected ECM below-ground communities, where multi-host fungal symbionts dominate in frequency (Fig. 2B). Second, in natural *T. melanosporum* truffle grounds, ECM communities are spatially structured at the among-brûlé scale and little influenced by host species and brûlé production status (i.e. presence or absence of truffle ascocarps; Table 4). Third, in this ecological context where *T. melanosporum* establishes spontaneously, both the frequency of ECM tips and the distribution patterns of soil mycelia only weakly mirror fruiting patterns within brûlés.

Thelephoraceae and *Pyrenomataceae* dominate in *Q. ilex* forests

On all host species and in all production stages, half of ECM tips revealed either a *Thelephoraceae* or a *Pyrenomataceae* (Fig. 1A). The dominance of these two families was expected because a similar pattern has been regularly observed in natural truffle grounds, whatever the focal species of *Tuber*, including *T. melanosporum* (Belfiori *et al.*, 2012), *T. macrosporum* (Benucci *et al.*, 2014) and *T. magnatum* (e.g. Murat *et al.*, 2005; Leonardi *et al.*, 2013; Salerno *et al.*, 2014), as well as in truffle plantations (see De Miguel *et al.*, 2014 for a review).

The observed ratio of Ascomycetes to Basidiomycetes strikingly contrasts with that reported from mature forest ecosystems (see Horton and Bruns, 2001 for a review), and particularly with that from late successional *Q. ilex* forests: in old and mature *Q. ilex* forests (Richard *et al.*, 2005; 2011; Shahin *et al.*, 2013), *Thelephoraceae* consistently dominate ECM communities, and to a lesser extent *Russulaceae* and *Cortinariaceae*, but very few ECM Ascomycetes colonize roots, except the dominant *Cenococcum geophilum*. Our results suggest that *Thelephoraceae* may continuously make up the dominant family during aging of *Q. ilex* forests, while the proportion of Ascomycetes (particularly *Pyrenomataceae*) may decline during succession, especially after canopy closure. These ascomycetes encompass species that may preferentially establish in early-successional vegetation. In all, these distribution patterns may reflect the contrasted ecological strategies (pioneer versus late stage) underlying ECM fungal diversity (Dickie *et al.*, 2013) and suggest that some temporal partitioning among fungal species may occur during forest development.

T. melanosporum brûlés reveal hyper-diverse and structured ECM communities

We showed that ECM communities in the three stages of brûlés, whatever their production status, are highly diverse (Table S2) and display a clustered OTU distribution at the levels of core (43% of all OTUs were found in a single core), plot (49.7% in a single plot) and site (58.3% in a single site). Interestingly, the contribution of each host species to these hyper-diverse and patchy communities was in the same range, as indicated by close rarefied richness values (Table S2) and similar OTU accumulation curves (Fig. S1) for the different hosts. The predominance of infrequent OTUs is in accordance with previously observed patterns in old *Q. ilex* forests (Richard *et al.*, 2011) and in naturally established brûlés of other truffle species. In a study comparing natural and cultivated *T. melanosporum* truffle grounds, Belfiori and colleagues (2012) reported high values of diversity indexes at natural sites and lower values in plantations. Conversely, high values of Shannon–Wiener indexes were calculated for natural truffle grounds of *T. magnatum* (Leonardi *et al.*, 2013) and *T. macrosporum* (Benucci *et al.*, 2014), with no clear difference between productive and non-productive locations for the latter species.

Three successive analyses of variance (PERMANOVA) showed that all the controlled factors included in our sampling scheme (i.e. site, plot, host species, production stage and canopy host species) significantly contributed to the distribution of fungal OTUs among samples, when a sample was defined as all ECM tips from a given host species in a given plot (Table 3). The tested factors explained a significant but moderate part of the variance of species distribution patterns: site, host species, canopy species and production stage accounted for only 2.9% to 4.7% of the variance among samples, whereas plot explained 39.6% of the variance among samples. The plot factor, of course, had a larger number of degrees of freedom than did other factors (Table 3). In detail, four noteworthy trends were revealed. First, two samples from the same site shared more OTUs on average than did two samples randomly taken from the whole dataset. Second, two co-occurring host species within the same plot shared more OTUs on average than did two samples randomly taken from the whole dataset. These two results illustrate the multi-scale patchiness and structuring by distance of ECM diversity (Lilleskov *et al.*, 2004; Pickles *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2014). Moreover, this suggests that the measured host sharing at the level of the whole dataset (Fig. 2A) is locally effective at the plot scale. Noticeably, fungal sharing was certainly underestimated in our study, because our sampling strategy excluded picking replicates of the same morphotype within a single core. Third, two samples taken under the canopy of the same plant

species shared more OTUs on average than did two samples randomly taken from the whole dataset, even when some ECM root tips belonged to a host other than the one forming the canopy (Table S1). Our systematic identification of plant and fungal partner of each ECM tip showed that the spatial distribution of canopies hardly reflects the distribution of roots in these mixed ECM plant communities, and that roots of ECM hosts intermingle in soils (Table S1). Our results indicate that the composition of the forest canopy influences the composition of the ECM fungal communities as much as root host species ($R^2 = 0.036$; $R^2 = 0.029$ respectively; Table 3). This may result from influences of canopy on direct (chemical composition of the resulting litters; e.g. Belsky *et al.*, 1993) and/or indirect (resulting micro-environmental conditions at ground level, e.g. humidity, temperature) environmental parameters (Conn and Dighton, 2000; Cullings *et al.*, 2003; Prescott and Grayston, 2013), which still need to be deciphered. Fourth, two samples taken in separate plots of the same production stage shared more OTUs on average than did two samples randomly taken from the whole dataset. This influence was as weak as that of other factors (e.g. host species), and we could not find fungal OTUs specific to a given host species or a production stage. However, a global signal emerged at the whole community scale (Table 3).

Yet the relatively high similarity between ECM communities in productive and non-productive brûlés contrasts with results of previous studies comparing ECM communities within and outside fruiting zones of focal species of Ascomycetes or Basidiomycetes. For instance, fungal communities beneath *Tricholoma matsutake* fairy rings are particularly species poor, and significantly differ from those inside and outside the fairy rings (Lian *et al.*, 2006). Our results suggest that stochastic changes in composition of ECM fungal communities, rather than directional shifts, accompany the dynamics of natural *T. melanosporum* truffle grounds from immature to post-productive brûlés.

Co-occurring hosts share frequent ECM symbionts on T. melanosporum brûlés

We showed that in brûlés and in the *Q. ilex* forest, a majority of ECM tips of all host species were associated with multi-host fungi (Fig. 1C). The steep slope of the interaction accumulation curve compared with that of the OTU accumulation curve summarizes this property of the ECM community (Fig. S1). Thanks to a systematic typing of hosts and symbionts, our study revealed that, in a complex plant community, frequent ECM fungal OTUs tend to be shared by several host species (Fig. 2B; right-hand part). These results confirm and extend previous research that mostly documented pairs of coexisting host

species (e.g. Horton and Bruns, 1998; Kennedy *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2008) and sometimes more than two coexisting host species (Ishida *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2011). Our results also provide evidence in favour of a previously hypothesized trade-off between specificity and abundance of ECM fungi (Vazquez *et al.*, 2005; Bahram *et al.*, 2014). Alternatively, these patterns could arise from under-sampling of ECM communities, as indicated by the unsaturated OTU accumulation curves obtained for all host species (Fig. S1). For this reason, caution is required before concluding about the apparent specificity of infrequent OTUs (Fig. 2B; left-hand part). Assuming under-sampling, the more frequently sampled an ECM OTU, the larger the number of its hosts. However, this scenario cannot readily explain the apparent absence of frequent single-host fungal OTUs (Fig. 2B; right-hand part) in ECM communities, which generally include fungal species that widely vary in their degree of specificity toward host species (Bruns *et al.*, 2002). Thus, the observed absence of abundant highly specific OTUs may indicate an ecological pattern of these ECM communities rather than a consequence of under-sampling.

This study provides a detailed view of fungal sharing among four different ECM hosts in Mediterranean landscapes. The picture obtained shows that *Q. ilex* shares a considerably smaller part (*ca.* one-half) of its OTU diversity with coexisting host species than do the three other species (which have *ca.* three-fourths of their OTUs shared with another host Fig. 2A). Our results also reveal a negative correlation between the sampling effort (number of sequenced ECM tips per host species) and the level of fungal sharing (comparing Fig. 2A and Table S1). Both results suggest that fungal sharing among host species must be analysed on samples of similar size for a satisfactory comparison of the relative contribution of each host species to plant-to-plant fungal links. When we used SESJ-distances to minimize sampling effects, we showed that two pairs of host plant species among the six possible pairs maximized their fungal sharing in terms of ECM assemblage resemblances, *A. unedo* and *C. albidus*, and to a lesser extent *A. unedo* and *Q. ilex* (Fig. 1A). Interestingly, the first pair are phylogenetically distant (*A. unedo* is the most distant phylogenetically from the three other species studied) but are the only two shrub species in our study. This result is in line with previous research showing that during ecological succession, co-occurring host species share more ECM fungal symbionts than do plants of different successional stages (e.g. Horton *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2007; Teste *et al.*, 2009). This trend had more impact here than any phylogenetic conservatism. Fungal sharing between *Q. ilex* and *A. unedo* has been previously documented for acidic soils (Richard *et al.*, 2005), where *A. unedo* also

appears in early succession (as in the present study), and where shared fungi represent 15% of taxonomic diversity, but 69% of the sampled roots. During secondary successions, various *Arbutioideae* species are supposed to be involved in facilitation processes that may be mediated by shared ECM fungal symbionts (Richard *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2012). Our results extend our knowledge of the ecology of these mid-successional shrubs that may be involved in the establishment of potential *T. melanosporum* hosts in Mediterranean landscapes.

ECM tips and mycelium partially reflect the production status of T. melanosporum brûlés

In our study, *T. melanosporum* ECMs were found only on *Q. ilex*, in spite of their frequency (Table 4). This is not a consistent pattern for the *Tuber* genus, since the four other OTUs were found on at least two host species each. The absence of *T. melanosporum* on *Q. coccifera*, *C. albidus* and *A. unedo* roots was unexpected regarding the evidence of ECM association, respectively, between *T. melanosporum* and diverse oak species (Callot, 1999), Tuberaceae and Cistaceae (Giovannetti and Fontana, 1982; Comandini *et al.*, 2006; García-Montero *et al.*, 2007) and Tuberaceae and *Arbutus* spp. (Kennedy *et al.*, 2012; Lancellotti *et al.*, 2014). Concerning *Q. coccifera*, we provided the first insights into its ECM fungal diversity in a season that is classically considered as optimal to describe Mediterranean ECM communities (Richard *et al.*, 2005). However, despite similar sampling efforts under the canopy of each host species, the number of ECM tips finally assigned to this species after host molecular identification was modest. This result suggests that the temporal and/or spatial distribution of ECM diversity on roots of *Q. coccifera* may differ from the other studied ECM hosts. Interestingly, the production of *Q. coccifera*'s fine root is reduced in winter (Kummerow *et al.*, 1990) when conditions are optimal to describe ECM diversity on *Q. ilex* and *A. unedo* roots (Richard *et al.*, 2005). At the scale of the whole study system, additional sampling in different seasons would specify the distribution of *T. melanosporum* on its potential Mediterranean hosts, and usefully increase our knowledge of the temporal dynamics of ECM communities (Courty *et al.*, 2008) in an ecological context that is still poorly documented.

In *T. melanosporum* brûlés, the black truffle was detected more frequently (as ECM tips) and more abundantly (as mycelia) before or at the production stage (*a* and *b*) than in non-productive stands (*c* and *d*; Fig. 3; Table 4). For each stage, and particularly at the production stage (*b*), the distribution pattern of soil mycelium tended to be heterogeneous (Fig. 3). Heterogeneous distributions of vegetative *T. melanosporum* structures were observed in previous studies comparing productive and

non-productive truffle grounds (Águeda *et al.*, 2010; Parladé *et al.*, 2013), and the biomass of mycelium in soils may vary significantly between seasons, as reported for some ECM fungal species (De la Varga *et al.*, 2013). The significant finding of our study was that some samples from immature and productive brûlés did contain high levels of truffle mycelium. These results support a developmental sequence where vegetative growth occurs before some fruiting eventually starts, and is substantially reduced in brûlés that no longer fruit. Similarly, in *T. melanosporum* orchards, Liu *et al.* (2014) reported significant expansion patterns of the spatial distribution of extra radical mycelium from a 20-year chronosequence design.

In our study, *T. melanosporum* became temporally the second most frequent OTU among ECM tips at the stage of productive brûlés (b). However, the frequency of ECM tips only partially reflects the presence of a *T. melanosporum* brûlé: in a majority of productive and all but one newly arisen brûlés (Table 4), we could not detect root tips infected by *T. melanosporum*. Our results again illustrate the well-known discrepancy between the distribution patterns of fruiting bodies and ECM tips (e.g. Gardes and Bruns, 1993; Koide *et al.*, 2005). Similarly, the distribution patterns of soil mycelia only partially mirrored the production status of brûlés (Fig. 3). Additional soil sampling would be necessary to compare the respective efficiency of mycelia and root tips in predicting fungal presence in this context (Anderson *et al.*, 2014). For the specific case of *T. melanosporum*, a recent study showed that the detection of the mating type in soil extracts can be a promising predictor of *T. melanosporum* production (Zampieri *et al.*, 2012).

In published work dealing with the particular case of *T. melanosporum* truffle grounds, all vegetative parts, the ECM tips and the mycelium are generally reported to be more abundant in productive stands than non-productive ones (Águeda *et al.*, 2010; Zampieri *et al.*, 2012; Parladé *et al.*, 2013), with few exceptions (Suz *et al.*, 2008). There is no clear threshold indicating the onset of ascocarp production (De la Varga *et al.*, 2012; Parladé *et al.*, 2013) and the presence of ECM tips can even be maintained over several decades in plantations without production (Águeda *et al.*, 2010). Similarly, the distribution of ECM tips poorly reflects the production of *T. magnatum* (Murat *et al.*, 2005; Leonardi *et al.*, 2013).

Interestingly, mycelium distribution in soils was highly heterogeneous, and mycelium abundance was remarkably low in all brûlés, even in productive ones, as compared with the observed values in plantations, albeit at a different season (Zampieri *et al.*, 2012; Parladé *et al.*, 2013). For instance, the measured mycelium concentration was more than 10 times lower than the concentrations measured by Parladé and colleagues (2013). As

suggested for ECM root tips, potential seasonal mycelium dynamics may occur and should be investigated in diachronic studies.

Conclusion

Beyond a detailed description of the diverse ECM communities in early-successional shrub Mediterranean vegetation, which has been poorly documented by fungal ecologists so far, the present work throws a spotlight on the ecology of *T. melanosporum* in natural ecosystems. Although the sampling of the fungal biodiversity in such ecosystems is still far from complete, and needs to be replicated in other seasons, our results raise questions about the way some ECM ascomycetes achieve an efficient pioneer strategy, i.e. establish early and subsequently dominate in hyper-diverse ECM communities. This work, which has documented for the first time the patterns of distribution of different vegetative parts of *T. melanosporum* (ECM tips versus mycelium), confirms the patchiness of this fungus, in contrasting contexts of natural production. In contrast to most ECM fungal species surrounding it, which are multi-host, *T. melanosporum* shows a marked affinity for *Q. ilex*. This work emphasizes the ecological strategy of *T. melanosporum* and mainly its surprising ability to establish and temporarily dominate hyper-diverse fungal communities.

Experimental Procedures

Study area

The research was performed in a set of private forests located around Pézilla-de-Conflent (southern France; 42°44'20.71"N, 2°29'12.02"E; elevation 240–763 m). The climate is Mediterranean with most rainfall in spring and autumn, reaching 572.4 mm yr⁻¹; monthly average temperatures vary between 4.4°C (mean January minima) and 29.2°C (mean July maxima). Soils are developed on a metamorphic limestone substrate. Physico-chemical properties of the organo-mineral horizon include a slightly basic pH (mean pH = 8.3 and mean pH_{KCl} = 7.6), with a silt loamy texture (11.64% clay, 40.3% silt, 48.1% sand) containing from 2.4% to 4.6% of organic matter (mean C: N ratio = 17.8).

Truffle grounds at the site established naturally on abandoned agricultural terraces that were previously cultivated as vineyards until the vines were uprooted in the early 1970s. The re-colonizing vegetation is made of shrub vegetation (the so-called 'garrigue' in French) dominated by *Phyllirea latifolia*, *A. unedo*, *C. albidus*, *Cistus ladanifera*, *Fumana ericoides* and *Juniperus oxycedrus* surrounding a discontinuous herbaceous layer. This vegetation is progressively colonized by *Q. ilex* and *Q. coccifera*, which form diffuse patches (< 25% cover) of various sizes. The four most abundant ECM host species, *Q. ilex*, *Q. coccifera*, *C. albidus* and *A. unedo*, hereafter abbreviated *Qi*, *Qc*, *Ca* and *Au*, respectively, were all sampled in the study.

Sampling design

Five sampling sites located at least 1 km apart were selected according to the simultaneous presence of relict forest patches and truffle grounds naturally established after agricultural activity had stopped. On these sites, plots with four different production stages were sampled, including: immature brûlés of recent origin, where visible impact of *T. melanosporum* on vegetation had been observed for less than 2 years and where truffles were not yet producing (stage *a*); productive brûlés, which had produced at least one truffle per season for at least 6 years (stage *b*); post-productive brûlés, which had ceased to produce truffles at least 6 years previously (stage *c*); and relict forests, i.e. patches of managed forests preserved from agricultural disturbance over at least the last 100 years, dominated by trees at canopy closure (stage *d*). On each site, replicate plots of the four different production stages were selected, thanks to the accurate knowledge of P. Bernadach, the owner of truffle grounds at all investigated sites. Because not all sites contained all production stages, from seven to 12 sampling plots were designated per site (Table 1).

Soil and ECM root sampling

Soil cores (diameter: 10 cm; depth: 15 cm) were collected in February 2011. On each plot, soil cores were drilled under the canopies of the four target host species (*Au*, *Ca*, *Qc*, *Qi*) at a distance of 20 cm from the base of the trunk. For each plant host species in each plot, two to three replications were made. For *Ca* and *Au*, these corresponded to different randomly selected individuals. Because *Quercus* species were often represented by a single individual on each plot, for *Qi* and *Qc*, three replications were made around the focal tree individual (approximately 1 m apart from each other). Because not all plots contained all four host species, from three to eight cores were collected per plot (Table 1). They were stored at 4°C after sampling and treated in the laboratory as follows. In each core, ECM roots were manually separated from the soil matrix. The resulting soil volumes were sieved and stored at –20°C, while sorted roots were washed gently and examined for assessment of ECM diversity. In each soil core, all ECM root tips were classified into morphotypes under a dissecting microscope according to Richard and colleagues (2005). Each core was treated independently, i.e. no attempt was made to assign ECM root tips of similar morphology to a given morphotype when they came from different cores. In each core, from one to five ECM tips of each morphotype were hand-picked, rinsed twice in distilled water and stored dry at –20°C.

Molecular identifications

In each soil core, molecular analysis of one randomly selected ECM root tip per morphotype was conducted in order to identify both plant and fungal partners.

Identification of ECM fungi. Total deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from ECM tips with the REExtract-N-Amp Plant polymerase chain reaction (PCR) kit (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) according to the manufacturer's

recommendations. The internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) region of the fungal nuclear ribosomal DNA was amplified by PCR using the ITS1F – ITS4 primer pair (Gardes and Bruns, 1993). The PCR reaction was performed in a 20 µl reaction volume containing 10 µl of REExtract-N-Amp PCR ReadyMix (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), 1 µl of each primer at 10 µM, 6 µl of distilled water and 2 µl of extracted DNA. Amplified DNA was checked on 1.5% agarose gels and (whenever a single clear fragment was observed) sequenced using the primers used in PCR. Amplicons revealing more than one ITS fragment were re-amplified using ITS4B instead of ITS4 to target ECM Basidiomycetes and exclude endophytic or contaminant Ascomycetes (Rodriguez *et al.*, 2009), which are often responsible for multiple ITS amplification. Raw sequence data were edited using CodonCode Aligner (CodonCode, Centerville, MA, USA) and operational taxonomic units (OTUs) were delineated at the 97% similarity threshold (Hughes *et al.*, 2009). For each OTU, consensus sequences were identified using the massBLAST algorithm (<http://unite.ut.ee/>) and the UNITE, GenBank, EMBL, DDBJ databases. Sequences were taxonomically assigned to the nearest blast name at the species, genus or family level when their similarity was more than 97%, between 95% and 97%, and less than 95% respectively. One sequence per OTU was deposited in GenBank under accessions no. KM247623 – KM247779 (Table S3).

Identification of host species. In order to identify the species hosting, all successfully sequenced ECM tip DNA, extracted DNA was amplified by PCR using the ITS1P – ITS4 primer pair as in Selosse and colleagues (2002). After verification on a 1.5% agarose gel, 15 µl aliquots of amplified DNA were digested by BsaWI endonuclease, which was selected for its ability to provide unambiguously different RFLP patterns for *Au* (163/122/489 bp), *Ca* (707/74 bp), *Qi* (478/301 bp) and *Qc* (779 bp). Polymerase chain reaction products were size fractionated on 2% agarose gels. For each RFLP pattern, five randomly selected samples were sequenced to confirm host identity.

Assessment of *T. melanosporum* mycelium distribution in soil. Total DNA was extracted from sieved soils belonging to stages *a* (eight plots), *b* (eight plots), *c* (seven plots) and *d* (six plots) (Table 1) with the kit Power Soil (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. In order to provide a representative view of each sampled plot, soil aliquots (2 g) from four independent soil cores per plot were pooled and analysed as follows. To quantify the extra radical mycelium of *T. melanosporum*, we used quantitative Taqman PCR (qPCR) with the primers and probe described in Parladé and colleagues (2013). Triplicate real-time PCR was performed on each sample using the 2X Takara Premix Ex Taq (Perfect Real Time, Takara Bio Europe, SAS, France), the specific oligos at a concentration of 800 nM for each primer and 200 nM for the probe, 5 µl of the template DNA and high-performance liquid chromatography (HPLC) water to adjust to a final reaction volume of 20 µl. The thermocycling program was 95°C for 30 s, followed by 40 cycles at 95°C for 5 s and 60°C for 34 s, and was performed in a StepOne Plus Real-Time PCR System machine provided with the STEPONE software v. 2.3 (Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA). For each site, a standard was prepared by adding 0.01 g of fresh immature *T. melanosporum* ascocarp to 0.24 g of soil collected in an adjacent field without ECM hosts. Deoxyribonucleic acid extraction was performed on each standard as above. A triplicate of four serial 10-fold dilutions of the standard extraction was used to plot a standard curve per site. The number of cycles (Ct values, i.e. number of cycles at which the fluorescent signal exceeds the background level in the exponential phase of the amplification) obtained for each dilution was plotted against the corresponding initial amount of ascocarp to generate the standard curve. Thus, a direct correspondence was obtained between the DNA extracted from known amounts of fresh ascocarp and the Ct values. Absolute quantification of mycelium biomass of *T. melanosporum* was expressed in µg of mycelium per g of soil for each soil sample.

Statistical analyses

Species diversity was estimated using the R package Vegan (Oksanen, 2011) to calculate four diversity estimators classically used in ECM community analyses: (i) the rarefied number of OTUs as a size-independent richness proxy of samples; (ii) Simpson's diversity index (1-D); (iii) the Shannon–Wiener information index (H') and (iv) Fisher's alpha (α). The influence of sampling scales (site and plot; Table 1) on ECM community composition was tested using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA; Anderson, 2001) in R package Vegan.

The influence of plant species (*Au*, *Qi*, *Qc*, *Ca*; identified on root tips, or as a component of above-ground canopy species) and production stage (*a*, *b*, *c*, *d*) on ECM community composition was analysed as follows. First, the overall effect of the two factors was tested using PERMANOVA as above. Second, paired comparisons were performed to compare the ECM fungal communities of each host and each production stage with those of all the others. These pair-wise comparisons were achieved by calculating Jaccard distances [*J*(*A*, *B*)] using the R package Vegan (Oksanen, 2011). In order to assess if the observed Jaccard distances differed significantly from dissimilarities that would be expected by chance alone, we used a null model approach (Gotelli and Entsminger, 2001; function *permatswap* in R library Vegan with the argument *fixedmar* = 'both'). The swap null model randomized the identity of OTUs (composition) among ECM assemblages of a given modality (i.e. either one of the four host species or one of the four production stages) but conserved the number of OTUs (richness) and the relative abundances of each OTU (structure) within each assemblage. The same pair-wise J-distances were calculated on 9999 randomized datasets and were used to calculate a standard effective size Jaccard distance (SESJ-distance), which minimizes the effect of unequal sizes of samples based on the Eq. (1):

$$\text{SESJ-distance}(A, B) = \frac{J(A, B) - \overline{[J(A, B)]_{nm}}}{\sigma[J(A, B)]_{nm}} \quad (1)$$

where $\overline{[J(A, B)]_{nm}}$ and $\sigma[J(A, B)]_{nm}$ are the mean and the standard deviation, respectively, of Jaccard distances given by the null model.

To analyse the relationships between ECM fungal frequency and number of associated host species, OTUs were classified into four classes depending on the number of their associated host species, from one to four. The correlation between the frequency of OTUs and the number of their hosts was estimated using Pearson's correlation coefficient. The influence of host and production stage on *T. melanosporum* abundance in soil was first assessed by examining abundance on ECM tips, by comparing the distribution patterns of *T. melanosporum* ECM tips on the four host species with a random distribution (previous described null model). If there was no significant difference from the distribution under the null model (9999 randomizations), it was considered that the pattern of *T. melanosporum* distribution could not be distinguished from that which would occur at random. The *P*-value was the proportion of the total number of host species in the null model that differed from the observed one.

Second, we investigated the influence of production stage on *T. melanosporum* abundance as measured by soil mycelium concentration. As the distribution of *T. melanosporum* concentration in soil at the plot level was non-normal (Shapiro test, *P* < 0.05), the homogeneity of variances among the four different production stages was tested by the non-parametric Fligner–Killeen test, which is robust against deviations from normality. Differences of mycelium abundances among production stages were tested by a Wilcoxon test. All these tests were performed using the R software (R_Development_Core_Team, 2014).

Acknowledgements

E. Taschen's PhD thesis work is funded by the Fondation de France (agroforestry research grants) and the Agence Nationale de la Recherche (grant 'Bases for a sustainable ecological monitoring of ecosystems producing truffles' (SYSTRUF), to M.-A. Selosse and F. Richard). Sequencing was financed by the grant 'Diversité des champignons mycorhiziens des plantes' (DivMyc, to M.-A. Selosse) from the network Bibliothèque Du Vivant funded by CNRS, Museum National d'Histoire Naturelle and INRA. Financial support for mycelium analysis was provided by the Spanish Ministry of Economy (MINECO), project AGL2012-40035-C03 to J. Parladé. We warmly thank Pierre Bernadach for providing access and communicating his knowledge of the study system. We are grateful to D. McKey for precious comments and for correcting the English of the manuscript, to G. Bonito for providing Tuber sequences, to E. Baudouin, M. Ducouso, O. Domergues, A. Galiana, D. Mousain, C. Roux and Y. Prin for help with soil sampling, to J.-M. Bellanger, L. Benoit and M.-P. Dubois for advice on the molecular work and to two anonymous referees for their advice.

References

- Águeda, B., Fernández-Toirán, L., Miguel, A.M., and Martínez-Peña, F. (2010) Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *For Syst* **19**: 89–97.

- Anderson, I.C., Genney, D.R., and Alexander, I.J. (2014) Fine-scale diversity and distribution of ectomycorrhizal fungal mycelium in a Scots pine forest. *New Phytol* **201**: 1423–1430.
- Anderson, M.J. (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* **26**: 32–46.
- Bahram, M., Harend, H., and Tedersoo, L. (2014) Network perspectives of ectomycorrhizal associations. *Fungal Ecol* **7**: 70–77.
- Belfiori, B., Riccioni, C., Tempesta, S., Pasqualetti, M., Paolocci, F., and Rubini, A. (2012) Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiol Ecol* **81**: 547–561.
- Belsky, A.J., Mwonga, S.M., Amundson, R.G., Duxbury, J.M., and Ali, A.R. (1993) Comparative effects of isolated trees on their undercanopy environments in high- and low-rainfall savannas. *J Appl Ecol* **30**: 143–155.
- Benucci, G.M.N., Raggi, L., Albertini, E., Gógán Csorbai, A., and Donnini, D. (2014) Assessment of ectomycorrhizal biodiversity in *Tuber macrosporum* productive sites. *Mycorrhiza* **24**: 281–292.
- Bingham, M.A., and Simard, S.W. (2011) Do mycorrhizal network benefits to survival and growth of interior Douglas-fir seedlings increase with soil moisture stress? *Ecol Evol* **1**: 306–316.
- Bonito, G.M., Gryganskyi, A.P., Trappe, J.M., and Vilgalys, R. (2010) A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal: global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA. *Mol Ecol* **19**: 4994–5008.
- Bruns, T.D., Bidartondo, M.I., and Taylor, D.L. (2002) Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integr Comp Biol* **42**: 352–359.
- Callot, G. (1999) La truffe, la terre, la vie. Paris, France: Editions INRA.
- Comandini, O., Contu, M., and Rinaldi, A.C. (2006) An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **16**: 381–395.
- Conn, C., and Dighton, J. (2000) Litter quality influences on decomposition, ectomycorrhizal community structure and mycorrhizal root surface acid phosphatase activity. *Soil Biol Biochem* **32**: 489–496.
- Courty, P.-E., Franc, A., Pierrat, J.-C., and Garbaye, J. (2008) Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Appl Environ Microbiol* **74**: 5792–5801.
- Cullings, K.W., New, M.H., Makhija, S., and Parker, V.T. (2003) Effects of litter addition on ectomycorrhizal associates of a Lodgepole Pine (*Pinus contorta*) stand in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **69**: 3772–3776.
- De la Varga, H., Águeda, B., Martínez-Peña, F., Parladé, J., and Pera, J. (2012) Quantification of extraradical soil mycelium and ectomycorrhizas of *Boletus edulis* in a Scots pine forest with variable sporocarp productivity. *Mycorrhiza* **22**: 59–68.
- De la Varga, H., Águeda, B., Ágreda, T., Martínez-Peña, F., Parladé, J., and Pera, J. (2013) Seasonal dynamics of *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* extraradical mycelium in pine forests of central Spain. *Mycorrhiza* **23**: 391–402.
- De Miguel, A.M., Águeda, B., Sánchez, S., and Parladé, J. (2014) Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza* **24**: 5–18.
- Dickie, I.A., Martínez-García, L.B., Koele, N., Grelet, G.-A., Tylianakis, J.M., Peltzer, D.A., and Richardson, S.J. (2013) Mycorrhizas and mycorrhizal fungal communities throughout ecosystem development. *Plant Soil* **367**: 11–39.
- Diette, S., and Lauriac, A. (2004) La sylviculture truffière: Aperçus historiques, apports techniques et enjeux pour la région méditerranéenne. *Rev For Fr* **56**: 219–230.
- García-Montero, L.G., Casermeiro, M.Á., Manjón, J.L., and Hernando, I. (2007) Impact of active soil carbonate and burn size on the capacity of the rockrose *Cistus laurifolius* to produce *Tuber melanosporum* carpophores in truffle culture. *Mycol Res* **111**: 734–739.
- Gardes, M., and Bruns, T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**: 113–118.
- Giovannetti, G., and Fontana, A. (1982) Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaceae. *New Phytol* **92**: 533–537.
- Girlanda, M., Selosse, M.A., Cafasso, D., Brilli, F., Delfine, S., Fabbian, R., et al. (2006) Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Mol Ecol* **15**: 491–504.
- Gómez-Aparicio, L., Zamora, R., Gómez, J.M., Hódar, J.A., Castro, J., and Baraza, E. (2004) Applying plant facilitation to forest restoration: a meta-analysis of the use of shrubs as nurse plants. *Ecol Appl* **14**: 1128–1138.
- Gotelli, N.J., and Entsminger, G.L. (2001) Swap and fill algorithms in null model analysis: rethinking the knight's tour. *Oecologia* **129**: 281–291.
- Grove, A.T., and Rackham, O. (2003) *The Nature of Mediterranean Europe: An Ecological History*. New Haven, CT, USA: Yale University Press.
- Holmgren, M., Gómez-Aparicio, L., Quero, J.L., and Valladares, F. (2012) Non-linear effects of drought under shade: reconciling physiological and ecological models in plant communities. *Oecologia* **169**: 293–305.
- Horton, T.R., and Bruns, T.D. (1998) Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytol* **139**: 331–339.
- Horton, T.R., and Bruns, T.D. (2001) The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* **10**: 1855–1871.
- Horton, T.R., Molina, R., and Hood, K. (2005) Douglas-fir ectomycorrhizae in 40- and 400-year-old stands: mycobiont availability to late successional western hemlock. *Mycorrhiza* **15**: 393–403.
- Hughes, K.W., Petersen, R.H., and Lickey, E.B. (2009) Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytol* **182**: 795–798.

- Ishida, T.A., Nara, K., and Hogetsu, T. (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytol* **174**: 430–440.
- Kennedy, P.G., Izzo, A.D., and Bruns, T.D. (2003) There is high potential for the formation of common mycorrhizal networks between understorey and canopy trees in a mixed evergreen forest. *J Ecol* **91**: 1071–1080.
- Kennedy, P.G., Smith, D.P., Horton, T.R., and Molina, R.J. (2012) *Arbutus menziesii* (Ericaceae) facilitates regeneration dynamics in mixed evergreen forests by promoting mycorrhizal fungal diversity and host connectivity. *Am J Bot* **99**: 1691–1701.
- Kipfer, T., Wohlgemuth, T., van der Heijden, M.G.A., Ghazoul, J., and Egli, S. (2012) Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single- and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *PLoS ONE* **7**: e35275.
- Koide, R.T., Xu, B., and Sharda, J. (2005) Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol* **166**: 251–262.
- Kummerow, J., Kummerow, M., and Trabaud, L. (1990) Root biomass, root distribution and the fine-root growth dynamics of *Quercus coccifera* L. in the garrigue of southern France. *Vegetatio* **87**: 37–44.
- Lancellotti, E., Iotti, M., Zambonelli, A., and Franceschini, A. (2014) Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza* **24**: 481–486.
- Lang, C., Seven, J., and Polle, A. (2011) Host preferences and differential contributions of deciduous tree species shape mycorrhizal species richness in a mixed Central European forest. *Mycorrhiza* **21**: 297–308.
- Leonardi, M., Iotti, M., Oddis, M., Lalli, G., Pacioni, G., Leonardi, P., et al. (2013) Assessment of ectomycorrhizal fungal communities in the natural habitats of *Tuber magnatum* (Ascomycota, Pezizales). *Mycorrhiza* **23**: 349–358.
- Lian, C., Narimatsu, M., Nara, K., and Hogetsu, T. (2006) *Tricholoma matsutake* in a natural *Pinus densiflora* forest: correspondence between above- and below-ground genets, association with multiple host trees and alteration of existing ectomycorrhizal communities. *New Phytol* **171**: 825–836.
- Lilleskov, E.A., Bruns, T.D., Horton, T.R., Taylor, D., and Grogan, P. (2004) Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 319–332.
- Liu, B., Fischer, C., Bonet, J.A., Olivera, A., Inchusta, A., and Colinas, C. (2014) Pattern of *Tuber melanosporum* extramatrical mycelium expansion over a 20-year chronosequence in Quercus ilex-truffle orchards. *Mycorrhiza* **24** (Suppl. 1): S47–S54.
- Maremmanni, A., Bedini, S., Matošević, I., Tomei, P.E., and Giovannetti, M. (2003) Type of mycorrhizal associations in two coastal nature reserves of the Mediterranean basin. *Mycorrhiza* **13**: 33–40.
- Médail, F., and Quézel, P. (eds) (2003) *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Cachan, France: Editions Lavoisier.
- Morris, M.H., Smith, M.E., Rizzo, D.M., Rejmánek, M., and Bledsoe, C.S. (2008) Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytol* **178**: 167–176.
- Murat, C., Vizzini, A., Bonfante, P., and Mello, A. (2005) Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiol Lett* **245**: 307–313.
- Napoli, C., Mello, A., Borra, A., Vizzini, A., Sourzat, P., and Bonfante, P. (2010) *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytol* **185**: 237–247.
- Oksanen, J. (2011) Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. R Package Version 1.
- Parladé, J., Varga, H., Miguel, A.M., Sáez, R., and Pera, J. (2013) Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. *Mycorrhiza* **23**: 99–106.
- Pickles, B.J., Genney, D.R., Potts, J.M., Lennon, J.J., Anderson, I.C., and Alexander, I.J. (2010) Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytol* **186**: 755–768.
- Plattner, I., and Hall, I.R. (1995) Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycol Res* **99**: 1367–1370.
- Prescott, C.E., and Grayston, S.J. (2013) Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. *For Ecol Manage* **309**: 19–27.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Richard, F., Millot, S., Gardes, M., and Selosse, M.-A. (2005) Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytol* **166**: 1011–1023.
- Richard, F., Selosse, M.-A., and Gardes, M. (2009) Facilitated establishment of *Quercus ilex* in shrub-dominated communities within a Mediterranean ecosystem: do mycorrhizal partners matter? *FEMS Microbiol Ecol* **68**: 14–24.
- Richard, F., Roy, M., Shahin, O., Sthultz, C., Duchemin, M., Joffre, R., and Selosse, M.-A. (2011) Ectomycorrhizal communities in a Mediterranean forest ecosystem dominated by *Quercus ilex*: seasonal dynamics and response to drought in the surface organic horizon. *Ann For Sci* **68**: 57–68.
- Rodriguez, R.J., White, J.F., Jr, Arnold, A.E., and Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* **182**: 314–330.
- Salerni, E., Iotti, M., Leonardi, P., Gardin, L., D'Aguanno, M., Perini, C., et al. (2014) Effects of soil tillage on *Tuber magnatum* development in natural truffières. *Mycorrhiza* **24**: 79–87.
- Selosse, M.-A., Bauer, R., and Moyersoen, B. (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytol* **155**: 183–195.
- Selosse, M.-A., Richard, F., He, X., and Simard, S.W. (2006) Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends Ecol Evol* **21**: 621–628.

- Shahin, O., Paul, N.M.-S., Rambal, S., Joffre, R., and Richard, F. (2013) Ectomycorrhizal fungal diversity in *Quercus ilex* Mediterranean woodlands: variation among sites and over soil depth profiles in hyphal exploration types, species richness and community composition. *Symbiosis* **61**: 1–12.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J., and Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biol Rev* **26**: 39–60.
- Sirami, C., Nespoulous, A., Cheylan, J.-P., Marty, P., Hvenegaard, G.T., Geniez, P., *et al.* (2010) Long-term anthropogenic and ecological dynamics of a Mediterranean landscape: impacts on multiple taxa. *Landsc Urban Plan* **96**: 214–223.
- Smith, S.E., and Read, D.J. (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, Third edn. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press. 3rd edition.
- Splivallo, R., Fischer, U., Gobel, C., Feussner, I., and Karlovsky, P. (2009) Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiol* **150**: 2018–2029.
- Streiblová, E., Gryndlerová, H., and Gryndler, M. (2012) Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiol Ecol* **80**: 1–8.
- Suz, L.M., Martín, M.P., Oliach, D., Fischer, C.R., and Colinas, C. (2008) Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum* – *Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 72–78.
- Teste, F.P., Simard, S.W., Durall, D.M., Guy, R.D., Jones, M.D., and Schoonmaker, A.L. (2009) Access to mycorrhizal networks and roots of trees: importance for seedling survival and resource transfer. *Ecology* **90**: 2808–2822.
- Vazquez, D.P., Poulin, R., Krasnov, B.R., and Shenbrot, G.I. (2005) Species abundance and the distribution of specialization in host-parasite interaction networks. *J Anim Ecol* **74**: 946–955.
- Wenkert, S., Roth-Bejerano, N., Mills, D., and Kagan-Zur, V. (2001) Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus*. *Plant Cell Rep* **20**: 369–373.
- Zampieri, E., Rizzello, R., Bonfante, P., and Mello, A. (2012) The detection of mating type genes of *Tuber melanosporum* in productive and non productive soils. *Appl Soil Ecol* **57**: 9–15.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Richness accumulation curves of ECM communities according to (A) host species, (B) production stages, (C) total community and host species–OTU interactions accumulation curves.

Fig. S2. Position of the five *Tuber* OTUs (annotated by a star symbol) among the nine major *Tuber* clades as defined by Bonito and colleagues (2010). Phylogeny is based on ITS nuclear rDNA (293 included positions) by an HKY85 model of nucleotide substitution. Maximum likelihood bootstrap values are shown above branches. Sequences are labeled with Latin binomials, GenBank accession or collection number and geographical origin (Bonito *et al.*, 2010).

Table S1. Sampling design, sequencing efficiency and proportion of reassigned root tips after RFLP analysis on the four sampled plant species. As roots were intermingled in soil, molecular identification led to re-attributions of ECM tips to the different host species.

Table S2. Ectomycorrhizal fungal diversity on four sampled host species and in four different production stages at the Pézilla-de-Conflent study sites. Host species are *Arbutus unedo* (Au), *Cistus albidus* (Ca), *Quercus ilex* (Qi) and *Q. coccifera* (Qc). Production stages are immature brûlés (a), productive brûlés (b), post-productive brûlés (c) and relict forests (d). Values in brackets indicate the standard error.

Table S3. Operational taxonomic units and accession numbers of the sequences submitted to GenBank.

Supplementary Material

Supplementary Tables

Table S1. Sampling design, sequencing efficiency and proportion of reassigned root tips after RFLP analysis on the four sampled plant species. As roots were intermingled in soil, molecular identification led to re-attributions of ECM tips to the different host species.

Parameter	<i>A. unedo</i>	<i>C. albidus</i>	<i>Q. coccifera</i>	<i>Q. ilex</i>	Total
Number of sampled plant individuals	27	29	29	31	119
Number of sampled ECM tips *	110	114	302	271	797
Number of identified ECM tips**	106	71	47	298	522
Percentage of discrepancy between targeted (canopy) and identified (ECM tips) species.	19.8	30.2	79.5	21.2	54

* Numbers of ECM root tips morphologically assigned to ECM hosts at the picking step.

** Numbers of ECM root tips re-assigned to ECM hosts after ITS-RFLP analysis.

Table S2. Ectomycorrhizal fungal diversity on four sampled host species and in four different production stages at the Pézilla-de-Conflent study sites. Host species are *Arbutus unedo* (*Au*), *Cistus albidus* (*Ca*), *Quercus ilex* (*Qi*) and *Q. coccifera* (*Qc*). Production stages are immature brûlés (*a*), productive brûlés (*b*), post-productive brûlés (*c*) and relict forests (*d*). Values in brackets indicate the standard error.

Parameter	Host species				Production stages							
	<i>Au</i>	<i>Ca</i>	<i>Qc</i>	<i>Qi</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>				
Number of plots	27	22	29	31	13	14	12	7				
Nb. of identified ECM tips	106	71	47	298	130	176	171	45				
Nb. of OTUs	59	42	35	113	70	72	79	26				
Rarefied* nb. of OTUs	33.63 (2.1)	32.5 (1.8)	33.2 (0.8)	35.4 (2.3)	34.2 (2.3)	33 (2.3)	34.4 (2.3)	26 (0)				
Fisher's alpha	54.8 (11.5)	46.2 (11.9)	58.2 (19.7)	66.3 (8.6)	61.8 (11.7)	46.5 (7.7)	57 (9.5)	25.7 (8.3)				
Simpson's (1-D) index of diversity	0.97	0.97	0.96	0.98	0.98	0.98	0.98	0.94				
Shannon-Wiener information index (H')	3.89	3.65	3.41	4.42	4.04	4.04	4.15	3.09				

* Rarefied by minimum sample size (45) for each community per host plant and production stage.

Table S3. Operational taxonomic units and accession numbers of the sequences submitted to GenBank.

OTU	Accession number*	Closest BLAST match **	E value	Max. identity	Division***	Consensus taxon	Number of ECM tips
168	KM247688	JQ685714	0.0	90	B	<i>Boletaceae</i>	1
169	KM247677	DQ273369	0.0	92.68	B	<i>Cantharellaceae</i>	2
c11	KM247626	FJ152538	0.0	98	A	<i>Cenoccocum sp.</i>	7
166	KM247663	FJ197924	0.0	99	B	<i>Clavulina sp.</i>	2
77	KM247672	JX625256	0.0	100	B	<i>Clavulina sp.</i>	2
32	KM247644	DQ083818	0.0	91.6	B	<i>Cortinariaceae</i>	2
24	KM247631	JF907862	3 E-132	85	B	<i>Cortinariaceae</i>	1
29	KM247709	AJ889942	0.0	95	B	<i>Cortinarius</i>	1
28	KM247710	DQ102686	0.0	99	B	<i>Cortinarius helobius</i>	1
27	KM247711	UDB001105	0.0	99.85	B	<i>Cortinarius mellinus</i>	1
26	KM247770	FJ897183	0.0	99.28	B	<i>Cortinarius sp.</i>	4
31	KM247708	FR852007	0.0	99	B	<i>Cortinarius sp.</i>	1
4	KM247682	HE687043	0.0	99	B	<i>Cortinarius sp.</i>	13
164	KM247681	JF908764	0.0	98	A	<i>Genabea sphaerospora</i>	16
35	KM247669	FJ197023	0.0	96.85	A	<i>Genea</i>	4
37	KM247707	JF908019	0.0	99.49	A	<i>Genea hispidula</i>	1
56	KM247676	FM206476	0.0	98.21	A	<i>Geopora sp.</i>	2
s7	KM247666	EU718105	7 E-177	93.78	B	<i>Gyroporaceae</i>	1
60	KM247701	JN943849	0.0	98.38	B	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	1
57	KM247771	GQ267472	0.0	99.31	B	<i>Hebeloma sp.</i>	7
s8	KM247772	FR852300	0.0	99.74	B	<i>Hebeloma sp.</i>	1
58	KM247664	FN397133	0.0	99.46	B	<i>Hebelomataceae sp.</i>	4
172	KM247634	JF927113	0.0	99	A	<i>Helotiales UI sp.</i>	4
40	KM247689	GU327422	0.0	96.13	A	<i>Helvella</i>	3
41	KM247706	JF506759	0.0	96.78	A	<i>Helvella</i>	1
42	KM247705	AJ544211	0.0	99.63	A	<i>Helvella lacunosa</i>	1
39	KM247658	HQ204665	0.0	99.05	A	<i>Helvella sp.</i>	4
38	KM247650	JF506761	0.0	98	A	<i>Helvella sp.</i>	8
s1	KM247632	KF000456	0.0	96.86	B	<i>Helvellosebacina</i>	1
170	KM247698	UDB015312	0.0	98.63	B	<i>Hydnellum auratile</i>	1
					B	<i>Hygrophorus quercetorum</i>	2
63	KM247639	AY463488	0.0	98	B	<i>Hygrophorus russula</i>	2
62	KM247633	JF908077	0.0	99	B	<i>Hygrophorus russula</i>	2
59	KM247702	GU327480	0.0	96.75	B	<i>Hymenogaster</i>	1
c1	KM247695	HM370474	0.0	95.9	B	<i>Inocybe</i>	2
s36	KM247670	JQ408748	0.0	98.14	B	<i>Inocybe arenicola</i>	1
45	KM247640	AM882728	0.0	98	B	<i>Inocybe griseolilacina</i>	3
5	KM247693	UDB015831	0.0	98.03	B	<i>Inocybe gymnocarpa</i>	3

51	KM247690	JN035291	0.0	100	B	<i>Inocybe rufuloides</i>	1
52	KM247704	EU668231	0.0	99	B	<i>Inocybe sp.</i>	1
53	KM247703	FJ210736	0.0	99	B	<i>Inocybe sp.</i>	1
47	KM247651	FR852242	0.0	99	B	<i>Inocybe sp.</i>	1
46	KM247657	HQ204675	0.0	100	B	<i>Inocybe sp.</i>	2
49	KM247646	HQ204682	0.0	99	B	<i>Inocybe sp.</i>	2
s54	KM247656	KF590034	0.0	99.39	B	<i>Inocybe sp.</i>	1
44	KM247647	JF908119	0.0	99	B	<i>Inocybe splendens</i>	4
50	KM247661	DQ067580	0.0	97.83	B	<i>Inocybe splendens</i>	2
43	KM247671	JF908109	0.0	97	B	<i>Inocybe tenebrosa</i>	8
48	KM247679	FN550937	0.0	99	B	<i>Mallocybe agardhii</i>	3
171	KM247643	HQ204691	0.0	98	B	<i>Melanogaster sp.</i>	2
167	KM247659	JQ619181	0.0	95	B	<i>Octaviana</i>	3
67	KM247700	JQ318644	0.0	97	A	<i>Peziza sp.</i>	1
64	KM247691	UDB015317	0.0	98.96	A	<i>Peziza succosa</i>	7
152	KM247739	FR852213	0.0	97.56	B	<i>Pseudotomentella sp.</i>	2
153	KM247750	UDB005577	0.0	98.86	B	<i>Pseudotomentella sp.</i>	2
s6	KM247642	EF484934	0.0	91.22	A	<i>Pyrenomataceae</i>	1
54	KM247654	FM206450	0.0	92	A	<i>Pyrenomataceae</i>	2
34	KM247675	HE687047	0.0	93	A	<i>Pyrenomataceae</i>	7
55	KM247629	JF908766	0.0	94.19	A	<i>Pyrenomataceae</i>	2
36	KM247667	JQ724069	0.0	88	A	<i>Pyrenomataceae</i>	4
s28	KM247712	UDB004145	2 E-102	91.07	A	<i>Pyrenomataceae</i>	1
165	KM247674	JQ976017	0.0	99	A	<i>Pyrenomataceae sp.</i>	4
72	KM247625	DQ061895	0.0	95	B	<i>Russula</i>	2
158	KM247638	JF908297	0.0	99	B	<i>Russula atlanticus</i>	7
71	KM247684	AY061700	0.0	99	B	<i>Russula insignis</i>	2
70	KM247680	HQ330996	0.0	99	B	<i>Russula sp.</i>	4
159	KM247623	FM213354	0.0	100	B	<i>Scleroderma cepa</i>	4
79	KM247627	FJ792845	0.0	96	B	<i>Sebacina</i>	3
75	KM247665	DQ520095	0.0	99	B	<i>Sebacina incrustans</i>	6
74	KM247668	EF372401	0.0	99	B	<i>Sebacina sp.</i>	5
82	KM247636	FJ210755	0.0	99	B	<i>Sebacina sp.</i>	2
78	KM247655	FJ556815	0.0	98	B	<i>Sebacina sp.</i>	2
81	KM247645	FJ803954	0.0	98	B	<i>Sebacina sp.</i>	3
76	KM247687	FJ803968	0.0	99	B	<i>Sebacina sp.</i>	8
80	KM247648	HQ154234	0.0	99	B	<i>Sebacina sp.</i>	2
176	KM247662	JN704834	0.0	99	A	<i>Sordariales UI sp.</i>	4
105	KM247773	UDB016485	0.0	99.23	B	<i>Thelephora sp.</i>	3
s22	KM247755	HQ667929	0.0	92.27	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
92	KM247734	UDB000035	0.0	92.92	B	<i>Thelephoraceae</i>	7
119	KM247736	UDB000035	0.0	93.61	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
134	KM247724	UDB000035	0.0	93.03	B	<i>Thelephoraceae</i>	2

s125	KM247774	UDB000035	0.0	94.52	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
85	KM247732	UDB001658	0.0	94.82	B	<i>Thelephoraceae</i>	9
135	KM247725	UDB002429	0.0	92.91	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
107	KM247756	UDB003309	0.0	94.95	B	<i>Thelephoraceae</i>	4
130	KM247720	UDB003312	0.0	90.08	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
s24	KM247752	UDB004959	0.0	91.72	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
87	KM247757	UDB011598	0.0	94.85	B	<i>Thelephoraceae</i>	11
s12	KM247761	UDB011637	0.0	94.64	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
131	KM247721	UDB013264	0.0	93.06	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
137	KM247727	UDB013336	0.0	94.58	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
116	KM247729	UDB016173	0.0	93.51	B	<i>Thelephoraceae</i>	3
86	KM247760	UDB016188	0.0	93.58	B	<i>Thelephoraceae</i>	11
94	KM247742	UDB016307	0.0	94.85	B	<i>Thelephoraceae</i>	6
109	KM247746	UDB016307	0.0	93.82	B	<i>Thelephoraceae</i>	4
112	KM247764	UDB016307	0.0	94.3	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
133	KM247723	UDB016307	0.0	94.07	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
143	KM247766	UDB016307	0.0	93.54	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
s123	KM247715	UDB016307	0.0	94.31	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
88	KM247741	UDB016404	0.0	94.42	B	<i>Thelephoraceae</i>	5
115	KM247740	UDB016404	0.0	92.9	B	<i>Thelephoraceae</i>	4
101	KM247759	UDB016439	0.0	94.24	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
122	KM247714	UDB016486	0.0	94.7	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
108	KM247737	UDB016489	0.0	93.54	B	<i>Thelephoraceae</i>	2
90	KM247743	UDB016491	0.0	92.55	B	<i>Thelephoraceae</i>	4
s124	KM247779	UDB016492	0.0	94.97	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
s136	KM247777	UDB016650	0.0	91.55	B	<i>Thelephoraceae</i>	1
124	KM247716	EF218835	0.0	95.83	B	<i>Tomentella</i>	3
s2	KM247713	EF619800	0.0	95.74	B	<i>Tomentella</i>	1
s5	KM247735	JF506816	3 E-155	95.16	B	<i>Tomentella</i>	1
s127	KM247775	UDB003321	0.0	95.92	B	<i>Tomentella</i>	1
s139	KM247778	UDB003321	0.0	95.44	B	<i>Tomentella</i>	1
110	KM247738	UDB004969	0.0	95.73	B	<i>Tomentella</i>	3
s23	KM247751	UDB011099	0.0	96.13	B	<i>Tomentella</i>	1
98	KM247758	UDB013264	0.0	96.95	B	<i>Tomentella</i>	3
91	KM247765	UDB016392	0.0	95.74	B	<i>Tomentella</i>	5
93	KM247767	UDB016484	0.0	96.78	B	<i>Tomentella</i>	8
84	KM247733	UDB016492	0.0	96.47	B	<i>Tomentella</i>	9
104	KM247745	UDB003312	0.0	98.61	B	<i>Tomentella clavigera</i>	5
s31	KM247768	JX625332	0.0	98.12	B	<i>Tomentella sp.</i>	1
113	KM247748	UDB000238	0.0	99.48	B	<i>Tomentella sp.</i>	2
103	KM247753	UDB000264	0.0	99.83	B	<i>Tomentella sp.</i>	3
96	KM247744	UDB003278	0.0	99.84	B	<i>Tomentella sp.</i>	3
97	KM247730	UDB003357	0.0	98.48	B	<i>Tomentella sp.</i>	5

2	KM247747	UDB011637	0.0	97.6	B	<i>Tomentella sp.</i>	13
89	KM247731	UDB016363	0.0	97.47	B	<i>Tomentella sp.</i>	6
95	KM247749	UDB016370	0.0	98.04	B	<i>Tomentella sp.</i>	6
s132	KM247776	UDB016471	0.0	98.54	B	<i>Tomentella sp.</i>	1
126	KM247718	UDB016486	0.0	99.24	B	<i>Tomentella sp.</i>	1
114	KM247769	UDB016494	0.0	98.93	B	<i>Tomentella sp.</i>	2
99	KM247762	UDB016495	0.0	99.51	B	<i>Tomentella sp.</i>	4
100	KM247763	UDB016498	0.0	98.32	B	<i>Tomentella sp.</i>	3
144	KM247754	UDB016500	0.0	98.11	B	<i>Tomentella sp.</i>	2
s200	KM247696	GU060276	0.0	99.76	B	<i>Tricholoma argyraceum</i>	1
s201	KM247694	HQ184134	0.0	99.71	B	<i>Tricholoma atrofusca</i>	1
155	KM247673	EF644118	0.0	99	B	<i>Tricholoma scalpturatum</i>	8
156	KM247692	EU160596	0.0	99	B	<i>Tricholoma scalpturatum</i>	3
s202	KM247697	JF926918	0.0	99.71	B	<i>Tricholoma sp.</i>	1
154	KM247685	AF377212	0.0	99	B	<i>Tricholoma sp.</i>	6
s25	KM247686	AY573541	0.0	99	B	<i>Tricholoma sp.</i>	1
157	KM247637	AF241519	0.0	99	B	<i>Tricholoma squarrulosum</i>	4
c6	KM247678	UDB019593	0.0	93.14	B	<i>Tricholomataceae</i>	4
162	KM247628	FN397161	0.0	99.84	A	<i>Trichophaea sp.</i>	6
163	KM247699	GU811252	0.0	98	A	<i>Trichophaea woolhopeia</i>	1
s55	KM247635	FN397161	0.0	95.98	A	<i>Trichophaeae</i>	1
150	KM247683	FJ554516	0.0	100	A	<i>Tuber borchii</i>	6
146	KM247653	AF132506	0.0	99.23	A	<i>Tuber ferrugineum</i>	12
148	KM247641	GU810153	0.0	100	A	<i>Tuber melanosporum</i>	9
147	KM247652	FM205509	0.0	99.67	A	<i>Tuber oligospermum</i>	10
149	KM247649	GQ254859	0.0	99	A	<i>Tuber sp1</i>	6
33	KM247630	JF927070	0.0	98.56	A	<i>uncultured fungus</i>	20
175	KM247624	HE601897	0.0	99	B	<i>Xerocomus sp.</i>	2

* Submission of one representative sequence.

** Closest BLAST match of the OTU consensus sequence.

*** Ascomycetes (A); Basidiomycetes (B).

Figure S1

Richness accumulation curves of ECM communities according to (A) host species, (B) production stages, (C) total community and host species–OTU interactions accumulation curves.

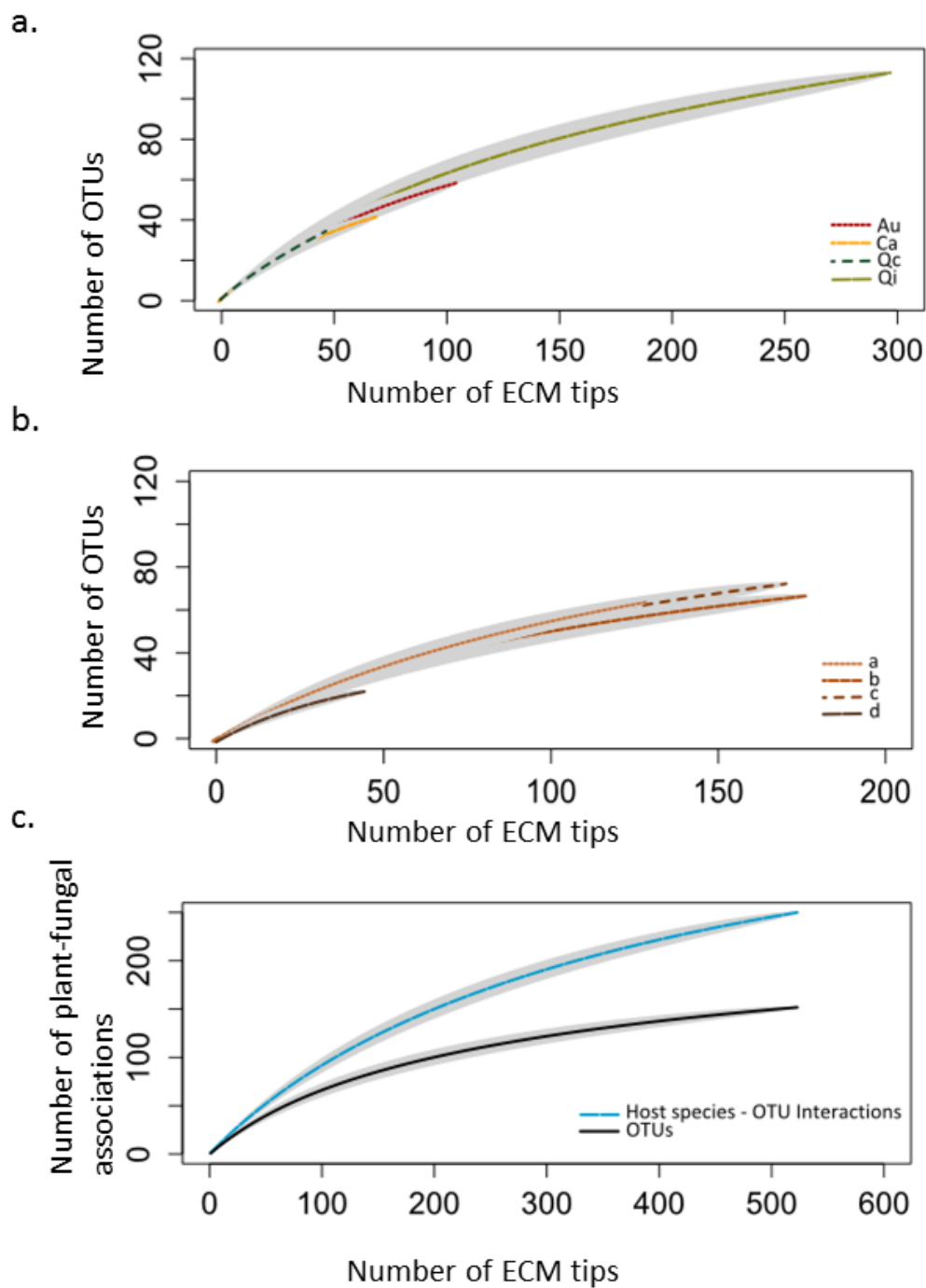
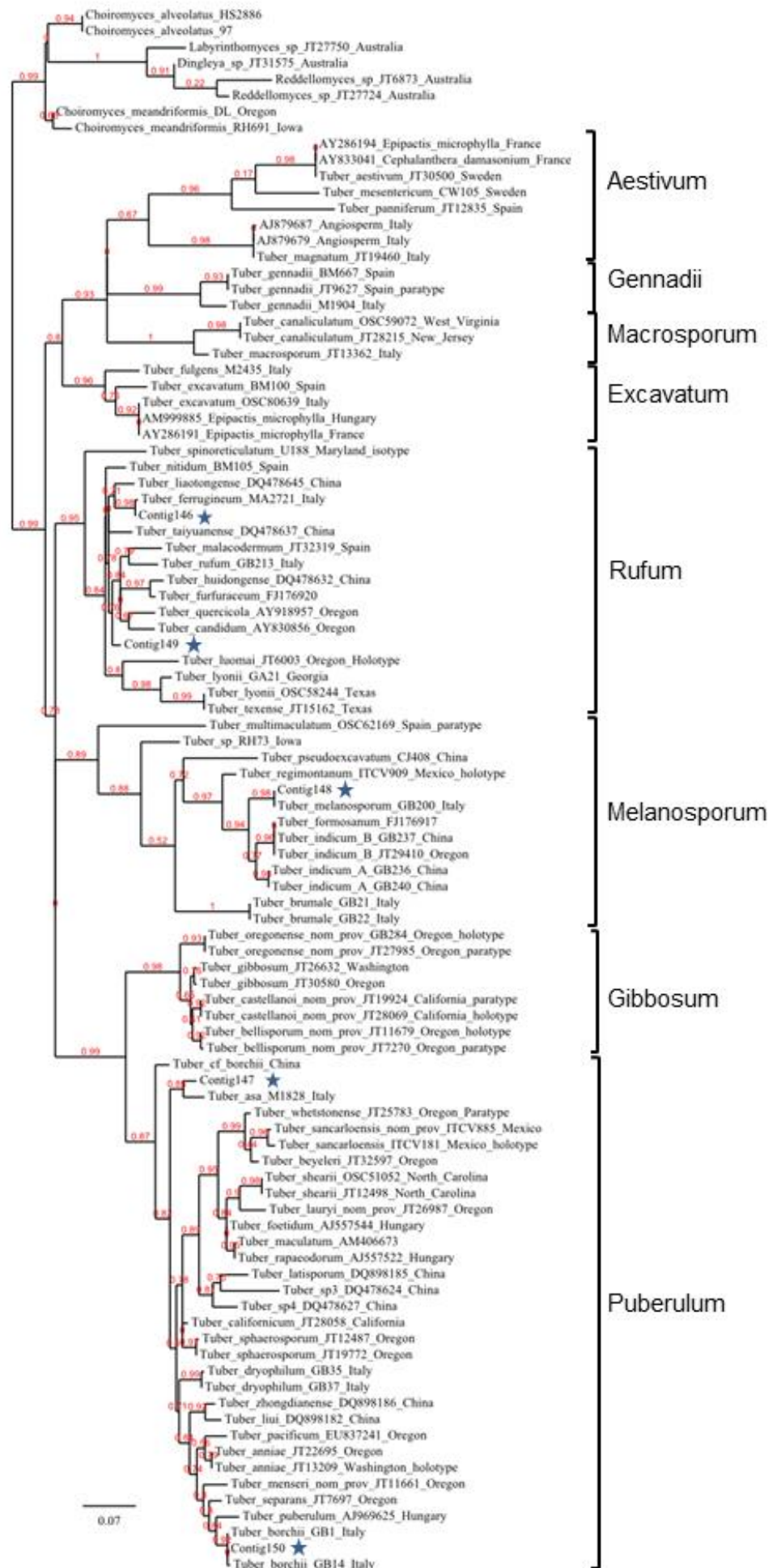


Figure S2

Position of the five *Tuber* OTUs (annotated by a star symbol) among the nine major *Tuber* clades as defined by Bonito and colleagues (2010). Phylogeny is based on ITS nuclear rDNA (293 included positions) by an HKY85 model of nucleotide substitution. Maximum likelihood bootstrap values are shown above branches. Sequences are labeled with Latin binomials, GenBank accession or collection number and geographical origin (Bonito *et al.*, 2010).



Chapitre II Interactions entre la Truffe, son hôte et des plantes non-ectomycorhiziennes

Mise en évidence expérimentale d'interactions tripartites entre la Truffe (*Tuber melanosporum*), son hôte et les plantes endomycorhiziennes communément présentes dans les truffières

Article 2: « Tri-partite interactions between the black truffle (*Tuber melanosporum*), the holm oak (*Quercus ilex*) and truffle grounds plants in mesocosm. »

Première version de l'article, qui sera à compléter après obtention des dernières mesures à effectuer à la fin du printemps 2015.

Résumé en français

Les mécanismes à l'origine des brûlés de *Tuber melanosporum* sont encore méconnus. Cependant leur présence suggère l'existence d'une interaction entre la Truffe, son hôte, et la communauté végétale dans son ensemble, dans laquelle les plantes à mycorhizes arbusculaires (AM) dominent. Parmi ces plantes, certaines sont, selon les dires des trufficulteurs, favorables au développement de la Truffe. De plus, l'effet du brûlé sur la plante varie en fonction de l'espèce : certaines périssent, alors que d'autres semblent peu ou pas affectées (**Fig. 1 de l'article**). A l'aide d'une expérience en mésocosmes, nous avons cherché à qualifier et à quantifier les interactions réciproques entre la Truffe, son hôte ectomycorhizien (ECM ; *Q. ilex*), et six espèces de plantes AM sélectionnées sur la base des connaissances empiriques des trufficulteurs, dans le but 1) d'identifier s'il existe des plantes qui favorisent le développement de la Truffe, 2) d'évaluer l'impact de la Truffe sur le développement de son hôte et de ces plantes AM et 3) d'évaluer de potentielles interactions plante-plante médiées par le champignon (**Fig. 2b de l'article**).

Une expérience en mésocosmes a été mise en place au printemps 2012 sur le terrain expérimental du CEF-CNRS de Montpellier. Dans chacun de ces mésocosmes, nous avons planté 1) un jeune plant de chêne vert, inoculé ou non inoculé, et 2) une des six espèces de plantes AM semée de part et d'autre du chêne (**Fig. 2a de l'article**). Les plantes choisies pour l'expérience étaient la fétuque ovine (*Festuca ovina*), l'égantier (*Rosa canina*), et le thym, (*Thymus vulgaris*), la flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*), le genêt d'Espagne (*Spartium junceum*), l'anthyllide vulnérable (*Anthyllis vulneraria* subsp. *praeproperea*). Leur classification réputée bénéfique et/ou sensible vis-à-vis de la Truffe est présentée dans la **Figure 3** (de l'article). Chacune des 14 modalités expérimentales (« inoculée vs. non inoculée » x « six espèces de plantes AM + contrôle sans plante AM ») a été répétée 10 fois, menant à un total de 140 mésocosmes. Pendant trois ans, un suivi diachronique de chaque mésocosme a été réalisé, prenant en compte (**Fig. 2c de l'article**):

- les traits de croissance, de nutrition (concentration carbone, azote, phosphore) et de la capacité photosynthétique du chêne (hôte ECM),
- le statut nutritionnel des plantes AM,
- et la concentration de mycélium de Truffe dans le sol.

Enfin, le nombre de germinations printanières spontanées (probablement issues d'une dispersion des plantes alentour) a été relevé sur les mésocosmes inoculés et non inoculés.

Nota bene : La dernière série de mesures, comprenant les mesures finales destructives telles que le taux de mycorhization et la mesure des biomasses aériennes et racinaires, seront effectuées entre mai et juin 2015.

Nos résultats montrent que la présence de trois espèces AM, la fétuque, l'anthyllide vulnérable et l'églantier, augmentent significativement la concentration de mycélium de Truffe dans le sol des mésocosmes (**Fig. 4 de l'article**), corroborant ainsi les dires des trufficulteurs sur deux des trois espèces empiriquement supposées favorables (fétuque, églantier et thym). Ces observations n'excluent pas une action favorable du thym sur d'autres traits de la Truffe, non mesurés ici, tels que la production et la maturation des ascocarpes.

Quant aux teneurs foliaires en C, N et P de chacune des six espèces AM, la Truffe ne semble pas affecter le statut nutritionnel de ces plantes en retour. En revanche, nous constatons un effet négatif de la Truffe sur la concentration globale en P des plantes AM (toutes espèces confondues) après deux années de croissance en présence du champignon (**Table 1 de l'article**). A l'inverse, l'inoculation profite au chêne en termes de concentrations foliaires en N et P et d'efficacité de la photosynthèse (ces différents paramètres n'étant sans doute pas indépendants), mais diminue la hauteur de la tige et le diamètre au collet (**Table 1 de l'article**).

En termes d'interactions indirectes entre plantes, il apparaît que la présence de certaines plantes AM tend à affecter la concentration en N du chêne, cependant que la présence de *T. melanosporum* inverse le sens de cette interaction (**Table 3 de l'article**). Il semblerait qu'au travers de l'effet bénéfique de certaines espèces AM sur le développement du mycélium de Truffe dans le sol, la concentration en N soit augmentée chez le chêne.

Enfin, le suivi du nombre de germinations spontanées montre une réduction significative dans les mésocosmes inoculés (**Table 2 de l'article**), indiquant un possible effet précoce de la Truffe sur la germination ou les premiers stades de développement des plantes AM, ce qui peut, au moins en partie, expliquer la physiologie des brûlés.

Ces résultats suggèrent que les brûlés sont le siège d'interactions indirectes entre plantes ECM et AM, dont l'intensité est espèce-dépendante, et dont le mécanisme est médié par la Truffe. Largement appuyés sur un savoir empirique par les trufficulteurs, cette expérience et ses résultats offrent à la fois des pistes pour de futures recherches et des perspectives expérimentales pour les itinéraires culturels truffiers.

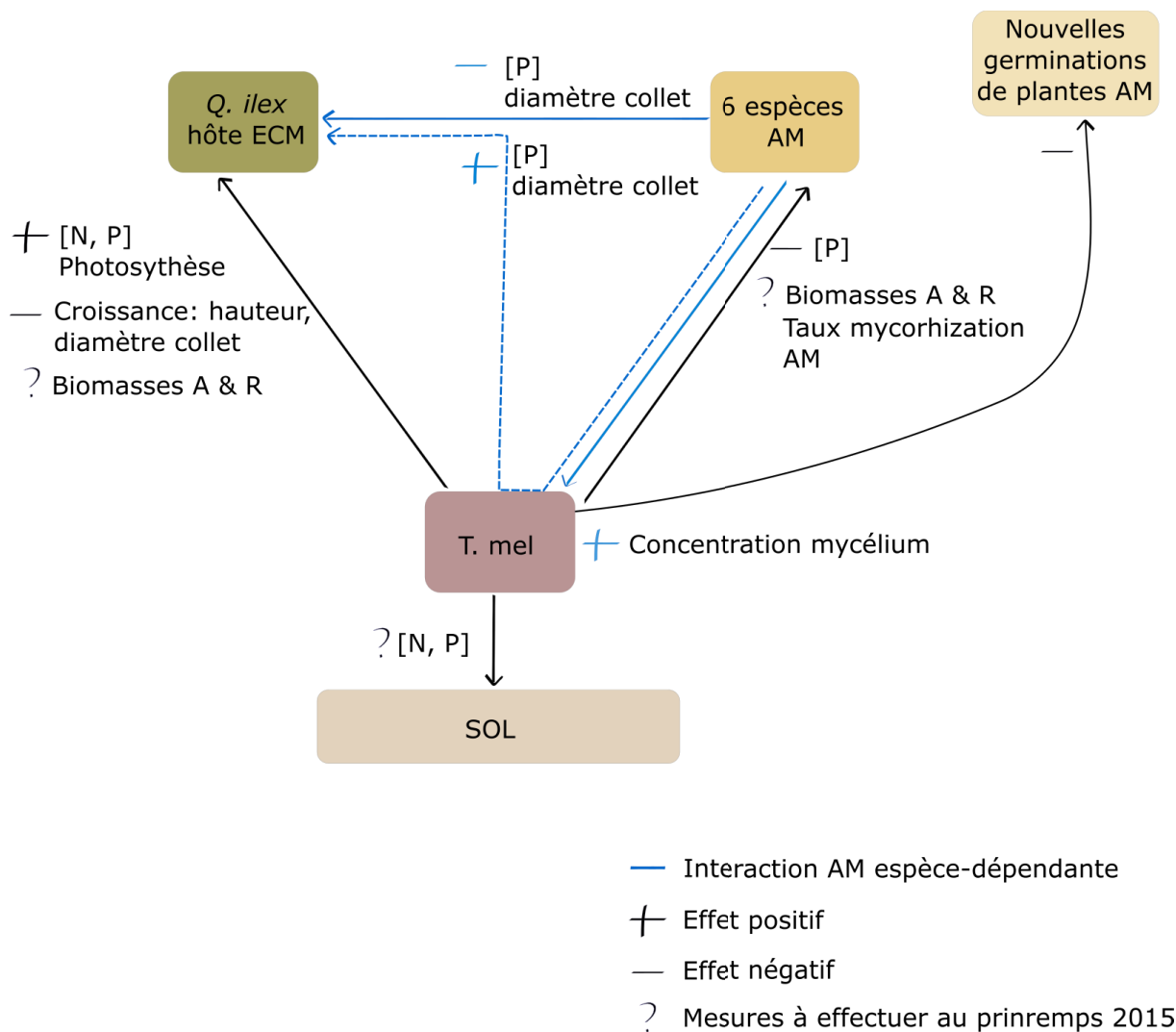


Figure 12. Schéma récapitulatif des principales interactions (positives ou négatives) mesurées entre la Truffe (*T. mel*), son hôte ectomycorhizien (*Q. ilex*), et six espèces de plantes AM. La médiation indirecte de la Truffe de l'interaction plante ECM - plante AM a été matérialisée par un trait en pointillés. (Biomasse A : aérienne ; R : racinaire).

Article 2

Tri-partite interactions between the black truffle (*Tuber melanosporum*), the holm oak (*Quercus ilex*) and truffle grounds plants in mesocosm.

E. TASCHEN¹, M. SAUVE¹, J. PARLADE², B. VINCENT¹, Y. AUMEERUDDY-THOMAS¹, B. ASSENAT³, M.-A. SELOSSE⁴, F. RICHARD¹.

¹ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier – EPHE- 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.

² IRTA, Sustainable Plant Protection, Centre de Cabrils km. 2, 08348 Cabrils, Barcelona, Spain.

³ Chambre d'Agriculture du Gard, 1120 Route de Saint-Gilles, 30932 Nîmes, France.

⁴ Muséum national d'Histoire naturelle, Département Systématique et Evolution (UMR 7205 ISYEB), CP 50, 45 rue Buffon, 75005 Paris, France.

Introduction

Understanding the influence of soil-mediated processes on the composition and the dynamics of plant communities is a central question in ecology. Because symbiotic life styles involving plants and microbes drive many soil interactions, the composition of plant communities influences the presence of diversified soil biota, and these effects on the microbial communities generate important feedbacks on plant coexistence and ecosystem functioning (van der Heijden *et al.*, 1998; Bever *et al.* 2012; Cipollini *et al.*, 2012; Van der Putten *et al.* 2013).

Mycorrhizal symbiosis is a crowded arena where complex interactions obligatory link plants and filamentous fungi. Mycorrhizal feedbacks shape the distribution of plants and fungi (see Bever *et al.* 2010 for a review) and provide pathways for organic and mineral carbon sources to heterotrophs and for soil nutrient and water to autotrophs (Smith & Read, 2008). On earth, 85% of plant species (Brundrett 2002) are concerned by two main types of mycorrhizal associations that differ in morphology and involved taxa: whereas most herbaceous species

develop arbuscular mycorrhizae (AM) with Glomeromycetes, temperate forest trees (e.g. Pinaceae, Fagaceae and Betulaceae) form ectomycorrhizal mycorrhizae (ECM) with Ascomycetes and Basidiomycetes. In temperate ecosystems, the co-occurrence of AM and ECM plants in most communities generates plant-plant interactions through soil feedbacks that remain poorly known (Dickie *et al.*, 2002).

The highly prized black truffle, *Tuber melanosporum* (Vittadini), is an ectomycorrhizal Ascomycetes that naturally colonizes early stages of Mediterranean oak forests. In this transitory vegetation, a mosaic of scattered ECM trees (e.g. *Quercus*, *Arbutus*, *Cistus*, *Helianthemum*), and AM shrubs (e.g. *Phillyrea*, *Pistacia*, *Juniperus*, *Rosa*) and herbs (e.g. *Brachypodium*, *Festuca*, *Anthyllis*, *etc.*), typically co-occur. The development of *T. melanosporum* in the soil is visible through the presence of the brûlé, a zone where the vegetation is reduced in density and diversity (**Fig.1**) through species-oriented deleterious effects (Martegoute & Courdeau 2002; Gonzáles-Armada *et al.*, 2010).

Figure 1. Picture of a typical *T. melanosporum* brûlé (**a**) with a focus on the vegetation at ground level (**b**). In panel (**a**), the approximative limit of the brûlé has been represented using a dotted circle. In panel (**b**), two species, *Festuca ovina* and *Saponaria ocymoides*, dominate the scarce plant community in the brûlé.



In these ecosystems, *T. melanosporum* may cumulate mutualist (on ECM host roots) and parasitic (with AM species) interactions, partially through volatile organic compounds emitted by belowground mycelia (see Streiblová *et al.*, 2012 for a review). Evidences of root surface colonization (Plattner & Hall, 1995; Taschen *et al.*, 2015 in preparation) and toxicity (Pacioni *et al.*, 1991; Splivallo *et al.*, 2007, 2009; Angelini *et al.*, 2014) of *T. melanosporum* mycelia toward AM plants have been shown in the laboratory. Nevertheless, internal colonization has not been observed yet and there is no clear evidence of a direct parasitism of AM plants by *T. melanosporum*.

Human practices deeply impact *T. melanosporum* truffle grounds, particularly in plantations. Present day, plantations with inoculated seedlings sustain most of truffle production (up to 80%, Hall *et al.*, 2003). Even so, the production remains uncertain depending on orchards, and strongly fluctuates in time and space. The truffle “culture” relies on highly diverse practices, based on empirical knowledge (Aumeeruddy-Thomas *et al.*, 2012), aiming at creating favorable environments for the vegetative development of the fungus (*i.e.* ectomycorrhiza and soil mycelium) and, more especially, for reproduction and maturation of the coveted hypogeous ascocarp (fructification). In particular, truffle growers pay attention to possible positive effects of co-occurring AM plants on *T. melanosporum* production. The ability of AM plants to contribute to *T. melanosporum* production was discussed in early publications about truffle culture (Bosredon 1887; Chatin 1869), but contrasted practices nowadays coexist. In plantations, while some truffle growers mechanically or chemically remove the understory vegetation (Olivera *et al.*, 2011), others selectively maintain specific plant species such as *Festuca ovina* that is empirically suspected to be beneficial for truffle production (Olivier *et al.*, 2012). To our knowledge, only two studies focused on the effects of AM plants of the brûlé and the development of *T. melanosporum*. Mamoun and Olivier (1997) showed that early sowing of *F. ovina* had a negative effect on mycorrhizal colonization on young hazel host plant, while Olivera *et al.* (2011) showed a beneficial effect of chemical weeding. Because, chemical weed control economically and ecologically (Negga *et al.*, 2011; Çavaş & Könen 2007; Edwards *et al.*, 1980) impacts the truffle ground, finding an alternative way of considering co-occurring AM vegetation is a central challenge. A better understanding of the interactions between

understory AM plants and *T. melanosporum* appears necessary to support responsible cultivation itineraries.

On the basis of two empirical observations, stating that 1) certain AM species are favorable to *T. melanosporum* development and 2) some AM species are more affected by the brûlé than others, we here considered truffle grounds as a tripartite interaction systems involving an ECM fungus (*T. melanosporum*), an ECM host (*Q. ilex*) and a set of AM naturally co-occurring plants. We used a mesocosm experiment (**Fig. 2a**) to decipher the interactions between *Q. ilex* seedlings inoculated with *T. melanosporum* and a selection of six AM plants species selected for their supposed interaction with *T. melanosporum* according to truffle growers. Physiological and developmental traits were measured on plants (*Q. ilex* and the AM plants) and *T. melanosporum* concentrations in soil was measured by quantitative PCR. After extracting a list of AM candidate plant species from grey literature and questionnaires addressed to truffle growers, we successively 1) compare the influence of the different AM species on the vegetative development of *T. melanosporum*, 2) reciprocally investigate the feedback by *T. melanosporum* on *Q. ilex* and AM species and 3) the evidence of indirect *Q. ilex* – AM species interaction through *T. melanosporum* (**Fig. 2b**). This last point addressed a more fundamental ecological question, hypothesizing that plant-plant interactions are partially mediated by the symbiotic soil compounds (Bever *et al.*, 2012; van der Putten *et al.*, 2013).

The experiment was settled up in 2012 and monitored over the last three years. As the end of the experiment is scheduled for spring 2015, the manuscript is based on results obtained so far (**Fig. 2c**).

Figure 2. a. View of the experimental design showing replicate mesocosms containing three-years old *Q. ilex* seedlings planted between patches of AM plants (*A. odoratum* or *S. junceum* or *A. vulneraria* or *R. canina* or *F. ovina* or *T. vulgaris* or none). The picture is centered on a mesocosm containing two cuttings of *R. canina* growing on each side of one *Q. ilex* individual. **b.** Schematic illustration of the studied interactions between *Q. ilex* (Qi), the AM species, and *T. melanosporum* (T. mel). Arrows indicate the analyzed interactions, 1) the impact of AM species on the vegetative development of *T. melanosporum*, 2) the impact of *T. melanosporum* on *Q. ilex* and the different AM species, and 3) effect so of plant to plant interactions on *Q. ilex*.

a.



b.

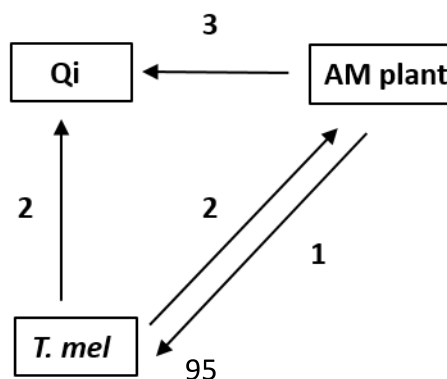


Figure 2 c. Schematic illustration of the sampling scheme of the study. Here are listed all parameters measured along the three years of the study, the different controlled factors and the declination of the subsequent modalities of the experiment.

c. Experimental design	Biotic component	Crossed factors	Measured parameters	Time schedule			
				Spring 2012	t+1	t+2	t+3
	Companion plant (AM)	7 modalities: No AM plant, or one species among 6: <i>S. junceum</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>A. odoratum</i> , <i>A. vulneraria</i> , <i>F. ovina</i> , <i>R. canina</i> .	Nutrition: [C], [N], [P]	/	✓	✓	
	Host, <i>Q. ilex</i> (Qi)		Development: Height, Basal circumference, Leaf area, LDMC, SLA	/	✓	✓	✓
			Nutrition: [C], [N], [P]	/	✓	✓	✓
			Photosynthesis: Chlorophyll content, Chlorophyll efficiency	/	/	✓	✓
	<i>T. melanosporum</i>	2 modalities: Non inoculation (-) Inoculation (+)	Mycelium concentrations in soil	/	/	✓	
	Spontaneous germination		Number of germinated seedlings, biomass			✓✓	
		Plant x Inoculation modality, n=10.					

Material and methods

Selection of AM species

The selection of AM species was obtained by the following steps. First, to record local empirical knowledge, questionnaires were sent to 130 truffle-growers designated by local truffle growers association from the French Mediterranean Region (Pyrénées-Orientales, 66; Gard, 30) in 2010. Each truffle grower was asked to list all plant species he supposed to either positively or negatively impact truffle production in his truffle ground. Results were compiled to affect to each named species the two following scores: the number of citations in both positive and negative categories, expressed in percent of the maximum number of citations in each category (to compare each cited plant genus to each other; **Fig 3**).

Two, we compiled from various sources (*e.g.* grey literature, Bosredon, 1888; Martegoute & Courdeau 2002; Olivier *et al.*, 2013; scientific publications, Gonzáles-Armada *et al.*, 2010, Plattner & Hall, 1995; discussions with truffle growers and personal observations) a second list of species that seem to contrastingly suffer from *T. melanosporum* interaction (*i.e.* species that seemed more or less affected by the brûlé).

From the assembled dataset made of the two lists, we extracted a final selection of six species that were 1) empirically positively associated with truffle production, 2) empirically contrastingly react to the brûlé 3) naturally present in plant communities growing on soils used in the mesocosm experiment (Pezilla-de-Conflent, France, see Taschen *et al.*, 2014 for a detailed description of the site) and 4) available on the market as seeds or usable vegetative propagules (cuttings). We made our choice to finally represent in our experiment an equal number (three) of species that either favor or disfavor *T. melanosporum* production according to truffle growers, and an equal number (three) of species that either suffer or support *T. melanosporum* presence.

Experiment settings

A mesocosm trial was settled up at the experimental field of CEFÉ laboratory (Montpellier, France) in spring 2012. Mesocosms of 50 x 7 cm by 45 cm depth were specifically designed for this experiment. Each mesocosm was filled with 16 L of a soil mixture realized as follows. Three tons of soil were collected at Pézilla-de-Conflent (south-east of France; 42°44'20.71"N, 2°29'12.02"E; elevation 240–763 m), in a natural truffle ground, and transferred to the laboratory. This soil was chosen because we had a satisfactory knowledge of its ability to grow *T. melanosporum* and the target companion plant species (see Taschen *et al.* 2014 for a detailed description of the site and its vegetation). The collected material was slightly basic (mean pH= 8.3 and mean pH_{KCl} = 7.6), with a silt loamy texture (11.64 % clay, 40.3 % silt, 48.1 % sand) and contained from 2.4 to 4.6% of organic matter (mean C to N ratio = 17.8). In the experimental field of CEFÉ laboratory, the soil was sieved (Ø 2 cm) to remove stones and roots, and mixed with 20% river sand to limit soil compaction. The mixture was vapor sterilized for 1 hour and transferred into mesocosms.

In each mesocosm, we planted 1) a single one year old *Quercus ilex* seedling and 2) one of the six selected AM species (**Fig. 2**; *Anthoxanthum odoratum*, *Spartium junceum*, *Thymus vulgaris*, *Festuca ovina*, *Anthyllis vulneraria* subsp. *praepropera*, *Rosa canina*) or nothing (None, *i.e.* no AM plant as a control). All AM species were sown, except for *R. canina* which was grown by cuttings. Oak seedlings were specially prepared for this experiment in the specialized nurseries AgriTruffe (Saint Maixan, France) as follows: a large number of acorns were collected on one single *Q. ilex* tree, divided in two subsamples. Half were inoculated with *T. melanosporum*, and the remaining seedlings were grown in identical nursery conditions but without inoculation.

In all, the sampling design included ten replicates of each of the seven plant modalities on each of the two inoculation modality, resulting in a total of 140 mesocosms (**Fig. 2a**). Four replicate blocks were created for this experiment that contained each a randomly positioned and constant number (n=10) of mesocosms per [plant x inoculation] modality (**Fig. 2c**). Plants were grown in the experimental field of CEFÉ laboratory. From middle June 2012 to the end of September 2014, mesocosms were watered every ten days (simulation of 10 mm rainfall)

by an irrigating system and a 60 % sun exclusion shade sail was installed to avoid soil temperature elevation.

Monitoring of T. melanosporum mycelium concentration

In spring 2014, *T. melanosporum* mycelium concentration in the soils of mesocosms was measured in ten repetitions per modality in the inoculated treatment and in five the in non-inoculated treatment. To limit the effect of potentially patchy distributions of fungal mycelia in mesocosms (Genney *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2014), two soil cores (1 cm diameter, 15 cm depth) were collected on each side of *Q. ilex* seedling, at a distance of 15 cm from the stem. After homogenizing, 2 g soil aliquots from each core were pooled to provide one measurement per container.

Total DNA was extracted from dried (72 hours at 35°C) and sieved soils with the kit Power Soil® (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. To quantify the extraradical mycelium of *T. melanosporum*, we used quantitative Taqman® PCR (qPCR) with the primers and probe described in Parladé *et al.* (2013). Triplicate real-time PCR was performed on each sample using the 2X Takara Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time, Takara Bio Europe, SAS, France), the specific oligos at a concentration of 800 nM for each primer and 200 nM for the probe, 5 µL of the template DNA, and HPLC water to adjust to a final reaction volume of 20 µL. The thermocycling program was 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s, and 60 °C for 34 s, and was performed in a StepOne Plus™ Real-Time PCR System machine provided with the StepOne software v. 2.3 (Life Technologies, Carlsbad, CA). A standard was prepared by adding 0.01 g of fresh immature *T. melanosporum* ascocarp to 0.24 g of soil collected in an adjacent field without ECM hosts and DNA extraction was performed as above. A triplicate of four serial tenfold dilutions of the standard extraction was used to plot a standard curve per site. The number of cycles (Ct values, *i.e.* number of cycles at which the fluorescent signal exceeds the background level in the exponential phase of the amplification) obtained for each dilution was plotted against the corresponding initial amount of ascocarp to generate the standard curve. Thus, a direct correspondence was obtained between the DNA extracted from known amounts of fresh ascocarp and the Ct values.

Absolute quantification of mycelium biomass of *T. melanosporum* was expressed in μg of mycelium per g of soil for each soil sample.

Measurement of physiological traits of Q. ilex and AM species

During the course of the experiment, yearly shoot growth and basal trunk circumference were repeatedly measured on all *Q. ilex* seedlings (**Fig. 2c**).

In five randomly selected mesocosms per modality each year, C, N and P concentrations were measured on *Q. ilex* and AM leaves as follows: on *Q. ilex*, 2012- and 2013-produced leaves were collected in May of each year. The same protocol was applied for all AM species, except for *S. junceum*. For this species, stems were sampled instead of leaves that were in insufficient amount at sampling date. Collected material was dried 72 hours at 35°C, grinded to powder and weighted on a high precision balance. C and N concentrations were measured in an NC Soil analyzer (EA1112 Series, ThermoFinnigan, Milano, Italy), and P concentration was measured after mineralization in a Smartchem 200 sequential analyzer (Frépillon, France). Results are expressed in mg.g^{-1} of dry biomass and thus referred to as concentrations.

In spring 2014, two different techniques were used to estimate photosynthesis efficiency of *Q. ilex* seedlings. The Chlorophyll Content Index (CCI) was obtained by measuring the absorption ratio of leaves between 931 and 653 nm with a SPAD-502 (Konica Minolta, Ōsaka, Japan). For accurate and representative results, three leaves produced in 2013 were collected on each oak and used for measurements. Each measurement was repeated three times on each leaf. The obtained CCI values were averaged for each *Q. ilex* and expressed in chlorophyll a + b concentrations (hereafter referred as Chlorophyll concentration) expressed in mg. cm^{-2} according to Silla *et al.*, (2010). As a sensitive indicator of plant photosynthetic performance, photosynthetic fluorescence was measured by a portable PAM 2000 fluorometer (Heinz Walz GmbH, Germany) according to Maxwell and Johnson (2000). Results were expressed in F_v/F_m (reflecting the potential quantum efficiency of the Photosystem II protein complex; Maxwell & Johnson 2000) reported as the maximum efficiency of photosynthesis.

Monitoring of exogenous germinations

During the course of the experiment, exogenous plant species spontaneously developed in mesocosms, either from remnant diaspore bank or from anemochorous seed dispersion of species growing in the experimental field of CEFE laboratory. We used this opportunity to assess whether *T. melanosporum* mycelia may affect or not the germination of these exogenous plants. In June 2014 and July 2014 (after two month without weeding), these germinations were systematically collected. The total dry biomass of each species was measured and compared between inoculated and non-inoculated treatments.

Statistical analyses

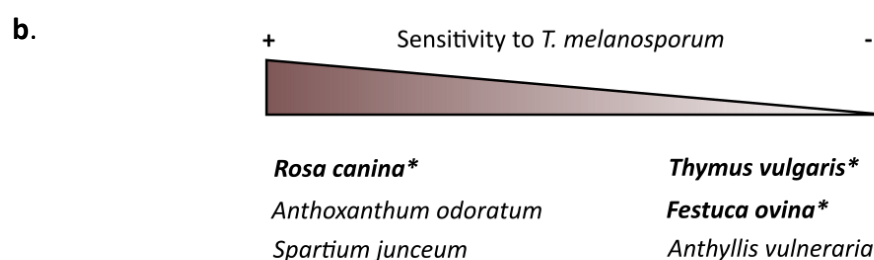
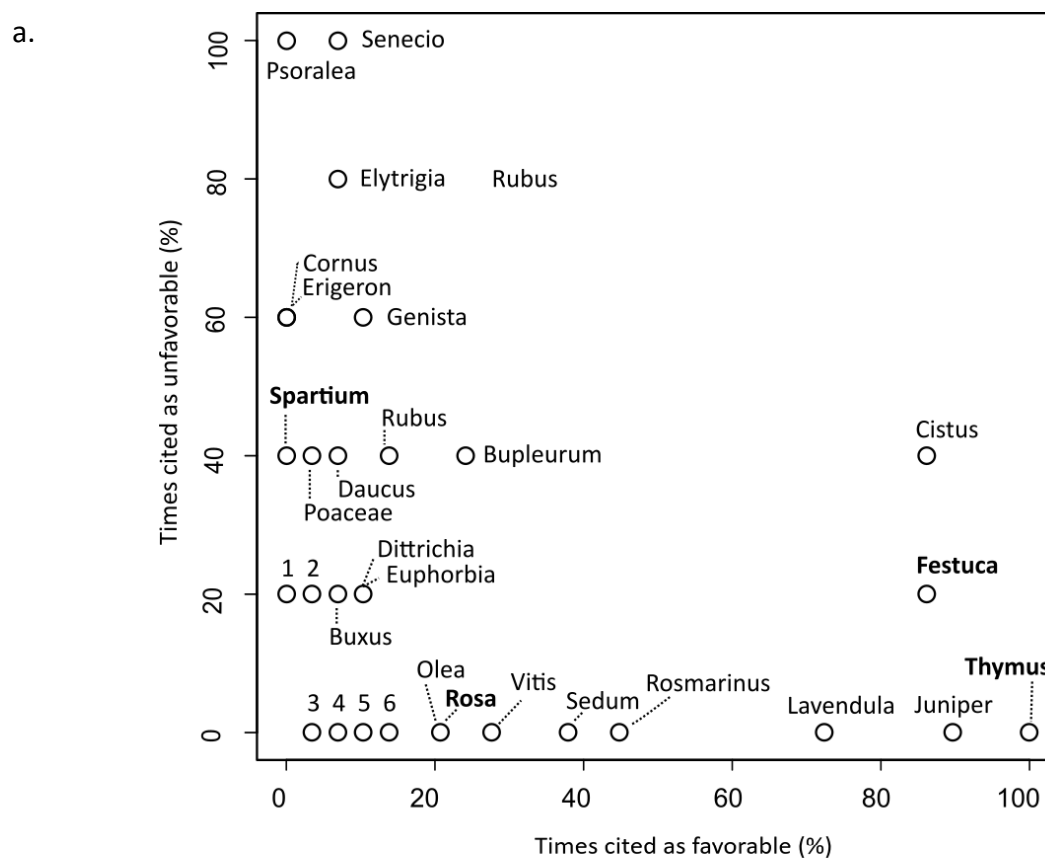
All statistical analyses were performed using R software (R_Development_Core_Team 2014). Wilcoxon Mann-Whitney test (hereafter referred to as Wilcoxon test) were performed for all pairwise comparisons. When pairwise Wilcoxon tests were used successively on a same trait, tests were corrected for false discovery rate (FDR, Benjamini & Hochberg 1995). Multiple comparisons of non-parametric values were performed by Kruskal-Wallis test. To test whether the plant modality and inoculation modality affected *Q. ilex* development, generalized linear models (GLM) were used on each measured trait, with separated (plant, inoculation) or crossed factors (plant x inoculation). Correlation between *T. melanosporum* mycelium concentrations and plant traits was tested by using non-parametric Spearman tests.

Results

Empirical typology of AM plant feedback on T. melanosporum according to truffle growers

In all, 33 out of 130 questionnaires were completed by truffle-growers who provided a list of plants species/genera/families ascribed as either favorable or unfavorable for *T. melanosporum* development (**Fig. 3**). Three favorable species were selected for the mesocosm experiment: *T. vulgaris*, *F. ovina* and *R. canina*. Based on their sensitivity to *T. melanosporum*, two groups of three species were distinguished and selected: sensitive species were represented by *R. canina*, *A. odoratum* and *S. junceum* on the one hand, and tested insensitive ones included *T. vulgaris*, *F. ovina* and *A. vulneraria* on the other hand (**Fig. 3**).

Figure 3. a. Status of the main plant genera and families present in truffle grounds regarding their influence on *T. melanosporum* production, as reported by truffle growers. The position of each plant taxon in the figure reflects the number of responses attesting a favorable (in abscise) and unfavorable (in ordinate) influence on *T. melanosporum* production. Numbers 1 to 6 refer to a large number of plant taxon that were rarely cited and not figured for the clarity of the figure. These taxons are listed in Table S1. Taxons in bold were selected for the experiment. **b.** Status of the six selected AM plants regarding their sensitivity to *T. melanosporum* according a compilation of empirical and published data.



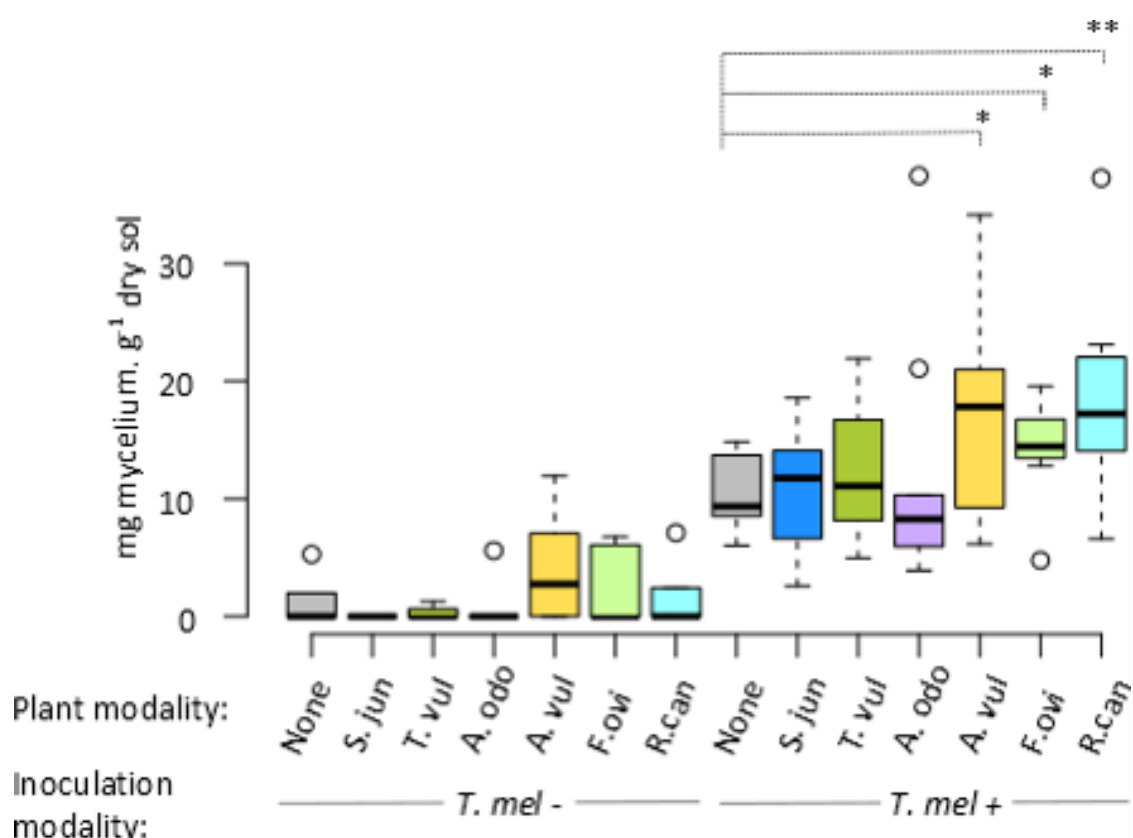
* Species empirically qualified as favorable to *T. melanosporum* development.

Effect of AM plants on T. melanosporum vegetative growth

The mean concentration of *T. melanosporum* biomass was significantly higher in inoculated than non-inoculated (13.4 ± 7.4 mg / g of dry soil; **Table 1**) mesocosms (Wilcoxon test, $W = 91$, $p\text{-value} < 0.001$; **Table 1**). In the non-inoculated mesocosms, soils collected near *A. vulneraria* and *F. ovina* mesocosms tended to have slightly higher concentrations of *T. melanosporum* mycelia than those collected under the four other plant species (4.3 ± 5.1 vs 2.5 ± 3.5 mg / g of dry soil respectively, **Fig. 4**).

Among the different modalities of AM plants, concentration of *T. melanosporum* mycelium in soil was significantly higher in presence of either *A. vulneraria*, *F. ovina*, or *R. canina* (Wilcoxon test with FDR, $p\text{. value} < 0.05$; **Fig. 2**) than in control modality (*i.e.* with no AM plant species). Interestingly, no plant species negatively impacted *T. melanosporum* concentrations, when compared to the control with no AM plant (**Fig. 4**).

Figure 4. *T. melanosporum* soil mycelium concentrations in mesocosms containing inoculated (T. mel +) or non-inoculated (T. mel -) *Q. ilex* seedlings, growing either alone (None) or with *S. junceum* (Sjun), *T. vulgaris* (Tvul), *A. odoratum* (Aodo), *A. vulneraria* (Avul), *F. ovina* (Fovi) and *R. canina* (Rcan). Lines in box plots are the medians of the measurement, and bars indicate the standard errors (n=10 replicate mesocosms). The influence of AM plant on *T. melanosporum* concentration in soil as compared to control (None) mesocosms was tested by pairwise Wilcoxon tests corrected for false discovery rate (p-value <0.05, *; <0.01, **).



Reciprocal response of AM plants to *T. melanosporum* presence

In spring 2013, there was no significant difference in C, N, and P concentrations in leaves of AM plants grown either with or without *T. melanosporum* (all AM species considered together; **Table 1**). However, tendencies of lower total N and P concentrations were observed in AM rowing in presence of *T. melanosporum* (**Table 1**).

Sampling		Spring 2013					Spring 2014				
Measures		N	Non-inoculated	Inoculated	Sign.	Impact	N	Non-inoculated	Inoculated	Sign.	Impact
Fungi	<i>T. melanosporum</i> mycelium biomass (mg mycelium / g of soil)						105	1.7 (3)	13.4 (7.4)	***	+
	Height (cm)	140	67.19 (16.64)	56.14 (14.07)	***	-	140	75.0 (17.1)	67.56 (13.4)	**	-
	Basal circumference (cm)	140	4.04 (0.42)	3.37 (0.37)	***	-	140	4.4 (0.7)	3.9 (0.7)	***	-
<i>Q. ilex</i> biometry	Leaf area (cm ²)	-	-	-	-		136	6.19 (3.04)	5.91 (3.18)	ns	=
	LDMC (%)	-	-	-	-		128	66.7 (9.1)	66.0 (5.78)	*	+
	SLA (m ² .kg ⁻¹)	-	-	-	-		128	5.32 (0.84)	5.33 (0.82)	ns	=
<i>Q. ilex</i> photosynthesis	Chlorophyll concentration (mg.cm ⁻²)	-	-	-	-		127	1.61 (0.08)	1.67 (0.07)	***	+
	Max. efficiency (Fv/Fm)	-	-	-	-		126	0.75 (0.05)	0.762(0.04)	*	+
<i>Q. ilex</i> nutrition [§]	[C]	70	4.73 (0.1)	4.77 (0.1)	ns	=	76	4.81 (0.07)	4.81 (0.05)	ns	=
	[N]	70	0.09 (0.01)	0.10 (0.01)	*	+	76	0.09 (0.02)	0.10 (0.02)	**	+
	[P]	70	0.59 (0.13)	0.77 (0.25)	**	+	76	0.74 (0.62)	0.74 (0.31)	ns	=
Total AM plant nutrition [§]	[C]	70	4.25 (0.38)	4.23 (0.39)	ns	=	61	4.44 (0.27)	4.49 (0.29)	ns	=
	[N]	70	0.12 (0.03)	0.12 (0.03)	ns	=	61	0.13 (0.05)	0.12 (0.05)	ns	=
	[P]	70	1.36 (0.76)	1.25 (0.61)	ns	=	44	1.29 (0.88)	0.89 (0.77)	*	-

[§] Values are expressed in mg.g⁻¹ of dry biomass.

Table 1. Measured traits on *T. melanosporum*, *Q.ilex* and the AM species in spring 2013 and 2014 (respectively after 1 and two years of growing). Differences between the inoculated and non-inoculated modality per trait were compared by a Wilcoxon test (p-value <0.05, *; < 0.01, **;<0.001, ***).

One year later (*i.e.* in spring 2014), P concentrations in leaves of AM plants were significantly lower in inoculated mesocosms as compared to the non-inoculated ones ($0.89 \pm 0.77 \text{ mg.g}^{-1}$ versus $1.29 \pm 0.88 \text{ mg.g}^{-1}$; **Table 1**). The difference was explained by a significant decrease of total P concentrations of AM leaves in inoculated mesocosms during the course of the experiment (year 2013 to 2014) that was not observed in non-inoculated ones (**Table 1**).

At the species level, the inoculation didn't significantly impact any AM plant species and only weak tendencies of N and P concentrations decrease could be observed (**Fig. S2**). The six different AM species were characterized by significantly different C, N, and P concentrations depending on the species (Kruskal-Wallis tests, <0.001 ; **Fig. S2**).

Impact of T. melanosporum on exogenous plants germination

In May 2014, the number of spontaneously germinated individuals in mesocosms (the six tested species apart) was significantly lower in inoculated than non-inoculated mesocosms (Wilcoxon test, $W = 3018$, $p\text{-value} < 0.01$) with respectively 1.3 ± 2.6 and 1.6 ± 1.8 shoots per mesocosm (**Table 2**). A second sampling realized two months later (July 2014) showed that the significant difference was maintained (Wilcoxon test, $W = 2869.5$, $p\text{-value} < 0.05$) with respectively 7.5 ± 7.8 and 9.8 ± 8.9 shoots per mesocosm in the inoculated and non-inoculated modality. Mean weight of shoots per mesocosm was lower in the inoculated than in the non-inoculated modalities with 0.16 ± 0.3 and $0.66 \pm 2.0 \text{ g}$ respectively (**Table 2**) but this tendency was not statistically supported because of high variation among non-inoculated mesocosms (Wilcoxon test, $W=2800$, $p\text{-value} > 0.05$). By pooling all mesocosms across AM plant modalities, the total dry biomass of exogenous plants sampled in non-inoculated and inoculated mesocosms (in July 2014) was respectively 31.21 and 11.31 grams. Compared to the control mesocosms with no planted AM species, the presence of our six tested species significantly reduced the number of germinations in both inoculated (Wilcoxon test, $W=395.5$, $p\text{-value} < 0.05$) or non-inoculated mesocosms (Wilcoxon test, $W=386$, $p\text{-value} < 0.05$; data not shown).

Table 2. Mean number of shoots and biomass of exogenous plant species sampled per mesocosm in April and July 2014. Values of the inoculated and non-inoculated treatments were compared by a Wilcoxon test (Significance *p-value* <0.05, *, < 0.01, **).

Sampling	Treatment	Mean nb. of shoots [§]		Significance	Mean shoots weight (g) [§]		Significance
April 2014	Inoculated	1.3	± 2.6	**	-	-	-
	Non inoculated	1.6	± 1.8		-	-	-
July 2014	Inoculated	7.5	± 7.8	*	0.2 ± 0.3		ns
	Non inoculated	9.8	± 8.9		0.7 ± 2.0		

[§] Measured per mesocosm.

Effect of T. melanosporum inoculation on Q. ilex host

The inoculation with *T. melanosporum* affected the general growth of *Q. ilex* plants with a mean reduction of 9 cm in height and 0.6 cm on the basal circumference in both 2013 and 2014 (**Table 1**). Leaf dry matter content of oaks was significantly lower when inoculated as compared to non-inoculated individuals (66 versus 66.7 %, Wilcoxon test, *p-value* <0.05; **Table 1**). Contrastingly, the two parameters relative to photosynthesis efficiency (Chlorophyll concentration and Maximum efficiency of photosynthesis) were significantly positively impacted when *T. melanosporum* was inoculated on *Q. ilex* roots (**Table 1**). In spring 2013, N concentrations were significantly higher in inoculated than in non-inoculated *Q. ilex* plants (0.10 ± 0.01 versus 0.09 ± 0.01 mg.g⁻¹, respectively; **Table 1**). A similar pattern was observed for P concentrations, with 0.59 ± 0.13 and 0.77 ± 0.25 mg.g⁻¹ in the inoculated and in the non-inoculated modalities respectively. In spring 2013, P concentrations of *Q. ilex* plants were positively correlated with the concentration in *T. melanosporum* mycelium in soil (Spearman correlation, *p-value* = 0.04, rho=0.31). One year later (spring 2014), there were no persistent difference on P concentration, but a significant difference was still measurable for N concentrations (0.09 ± 0.02 versus 0.10 ± 0.02 mg.g⁻¹ in inoculated and non-inoculated mesocosms, respectively; **Table 1**). At this time, N concentrations were positively correlated

with *T. melanosporum* mycelium concentrations in soils (Spearman correlation, p-value = 0.04, rho= 0.33). The inoculation modality did not impact C concentrations in *Q. ilex* leaves.

Plant-to-plant interactions

Effects of AM species, inoculation, and of the interaction between inoculation and AM species were tested by a GLM on all measured traits on *Q. ilex* (see **Table 1**). We showed a significant effect of AM species on height, basal circumference, C and N concentrations of *Q. ilex* (**Table 3**). Irrespectively of the inoculation treatment, AM species differentially impacted height, C and N concentrations, showing that plant-plant interaction impact on *Q. ilex* was AM species dependent. The inoculation by *T. melanosporum* modified the intensity and in some case the direction (negative or positive effect) of plant-to-plant interactions. In non-inoculated mesocosms, the presence of AM tended generally to reduced N concentrations in *Q. ilex* leaves, but the presence of *T. melanosporum* seemed to reverse these plant-to-plant interaction by enhancing N concentrations of *Q. ilex* leaves only when AM plants were present (**Table 3; Fig. S2**). Especially the three species (*A. vulneraria*, *F. ovina* and *R. canina*) enhancing *T. melanosporum* development in soil were significantly favorable for N concentrations in *Q. ilex*. This was probably due to the positive correlation observed between *T. melanosporum* mycelium concentration in soil and N concentrations in *Q. ilex*.

Discussion

Here we demonstrated that *T. melanosporum*, its ECM host, and co-occurring AM plant species participate to tripartite soil feedbacks that influence plant community dynamics at the early stage of truffle ground development. We evidenced AM species-dependent patterns of interaction where *T. melanosporum* mycelia 1) respond positively or neutrally to the presence of specific AM plant species, but 2) poorly and not reciprocally influence the nutrient status of AM species, and 3) mediate direct/indirect ECM-AM plant-plant interactions. Finally, we showed that *T. melanosporum* may reduce the recruitment of a large set of plant species that spontaneously germinate in truffle grounds.

<i>Q. ilex</i> traits		Ino.							Ino x							Intercept	Residual deviance	Degree Freedom
		<i>T. mel</i>	<i>S jun</i>	<i>Tvul</i>	<i>Aodo</i>	<i>Avul</i>	<i>Fovi</i>	<i>Rcan</i>	<i>Sjun</i>	<i>Tvul</i>	<i>Aodo</i>	<i>Avul</i>	<i>Fovi</i>	<i>Rcan</i>				
Height	Estimate	-6.3	2.61	1.47	-7.05	-5.1	-1.5	-14.6	-12.01	-7.67	2.7	-3.45	-1.25	16.3	77.9			
	Sd. Error	6.56	6.95	7.57	6.56	6.56	6.56	6.56	9.84	10.02	9.27	9.27	9.27	9.27	4.64			
	t value	-0.96	0.38	0.19	-1.08	-0.78	-0.23	-2.23	-1.22	-0.77	0.29	-0.37	-0.14	1.76	16.81	25364	118	
	p-value	0.34	0.71	0.85	0.28	0.44	0.82	0.03	0.22	0.45	0.77	0.71	0.89	0.08	<2e-16			
	sig.							*						.	***			
Basal circumference	Estimate	-0.18	-0.1	0.01	-0.17	0.03	-0.16	-0.46	-0.06	-1.13	-0.22	-0.3	-0.74	0.14	4.60			
	Sd. Error	0.29	0.3	0.33	0.29	0.29	0.29	0.29	0.43	0.44	0.4	0.4	0.4	0.4	0.20			
	t value	-0.63	-0.32	0.03	-0.61	0.1	-0.55	-1.61	-0.14	-2.58	-0.54	-0.75	-1.83	0.36	22.78	48.10	118	
	p-value	0.53	0.75	0.97	0.55	0.92	0.58	0.11	0.89	0.01	0.59	0.46	0.07	0.72	<2e-16			
	sig.									*			.		***			
[C]	Estimate	-0.01	-0.07	-0.05	-0.07	-0.03	-0.03	-0.06	-0.02	0.03	0.04	-0.02	0	0.04	4.86			
	Sd. Error	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.05	0.05	0.05	0.06	0.027			
	t value	-0.31	-1.87	-1.34	-1.92	-0.87	-0.69	-1.54	-0.37	0.59	0.71	-0.35	-0.03	0.69	180.476	0.22078	61	
	p-value	0.76	0.07	0.18	0.06	0.39	0.49	0.13	0.71	0.56	0.48	0.73	0.97	0.49	<2e-16			
	sig.		.		.										***			
[N]	Estimate	-0.02	-0.01	-0.01	-0.01	0	-0.02	-0.02	0.03	0.01	0.02	0.04	0.04	0.04	0.10			
	Sd. Error	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01			
	t value	-1.6	-1.47	-0.99	-1.39	-0.58	-2.26	-1.81	2.15	0.71	1.87	3.06	3.4	3.11	15.40	0.02	61	
	p-value	0.12	0.15	0.33	0.17	0.56	0.03	0.07	0.04	0.48	0.07	<0.001	<0.001	<0.001	< 2e-16			
	sig.						*	.	*		.	**	**	**	***			

Table 3. Results of generalized linear models (GLM, adjusted on a Gaussian model) on *Q. ilex* traits according inoculation (with or without *T. melanosporum* inoculation; Ino) and the companion plant species (*S. junceum*, *Sjun*; *T. vulgaris*, *Tvul*; *A. odoratum*, *Aodo*; *A. vulneraria*, *Avul*; *F. ovina*, *Fovi*; *R. canina*, *Rcan*) modalities and the interaction of both factors. The non-inoculated modality and the modality with no companion plant were used as references. Only traits presenting significant differences according modalities were reported (See Figure S1 for all results).

Do AM plant favor T. melanosporum development?

After two years of growing, *T. melanosporum* mycelium concentrations in soil were ten times higher in mesocosm with inoculated *Q. ilex* than in mesocosm with non-inoculated *Q. ilex* plants. With mean values of 13.4 mg of *T. melanosporum* mycelium per g of dry soil, concentrations recovered in the inoculated mesocosms were much higher than those found on natural and planted brûlés by Parladé *et al.*, (2013), varying from 0.15 to 0.4 mg mycelium per g of dry soil. In our experiment, young *Q. ilex* plants were initially massively inoculated with *T. melanosporum* which apparently developed well and densely colonized the surrounding soil in mesocosms. Furthermore, soil was previously sterilized, which may reduce the competition with other ectomycorrhizal species. Nonetheless, high values of truffle mycelium were found in soil of the *T. aestivum* summer truffle brûlé, with 2.18 mg dry mycelial biomass per gram of dry soil (Gryndler *et al.*, 2012).

In the framework of plant-microbe interactions, soil feedbacks considered study systems where 1) mutualists are of the same nature (AM plant and fungi, or ECM plant and fungi) and 2) the plant species is the focal individual (see Bever *et al.* 2012 for a synthesis). Here we crossed AM and ECM mutualisms to suggest that AM plant may have the ability to shape the distribution of ECM fungal species in soil. Interestingly, the presence of *A. vulneraria*, *F. ovina* and *R. canina* in the inoculated treatment significantly increased *T. melanosporum* mycelium concentrations in soil compared to the modality without AM. In the non-inoculated modality, small mycelium traces were recovered in soil maybe due to spore survival after sterilization and even those weak concentrations were particularly enhanced by the presence of *A. vulneraria* and *F. ovina* confirming the positive effect on *T. melanosporum* observed in the inoculated modality. This result experimentally demonstrates empirical knowledge, because it corroborates with the status of two (*F. ovina* and *R. canina*) out of three species considered as favorable for *T. melanosporum* development according to the truffle growers (**Fig.3 a**). No consensual definition of the meaning of “favorable for *T. melanosporum* development” was given by truffle-growers, who mainly relied their appreciation to ascocarp production. Interestingly, we observed a correlation between a suspected response on reproductive traits (truffle-growers observations) and a measurable effect on vegetative traits (mycelium

concentrations in soil). This finding provide additional insights into the current knowledge concerning the weak correlation between fruitbody production and mycelium concentrations (Suz *et al.*, 2008; Taschen *et al.*, 2014).

Positive effects of different AM-plants on the development of a focal ECM symbiont have been poorly investigated and theorized so far. To our knowledge only one study investigated the impact of a AM species on the development of *T. melanosporum*. From an empirical knowledge suggesting that *T. melanosporum* would positively respond to the presence of *F. ovina* on brûlés, Mamoun & Olivier (1997) qualified the influence of *F. ovina* on the ECM colonization on inoculated hazel plants. These authors showed a negative impact of sawing *F. ovina* on the colonization by *T. melanosporum* on 3 months-old seedlings. Several reasons could explain the apparent opposite patterns obtained in our study and in Mamoun & Olivier's experiment, including the nature of measured traits (mycelium concentrations vs. ectomycorrhizal roots colonization), different hosts (*Q. ilex* vs. *Corylus avellana*), development stages (1 year-old vs. 3 months-olds plants) and soil conditions.

The mechanisms involved in the positive effect of AM plants on *T. melanosporum* vegetative growth remain unclear. Biological, chemical, physical mechanisms and the interdependencies may act. Plants species modify biotic and abiotic conditions of the soil such as microbial communities, pH, chemical signature of organic matter, soil moisture through shading, etc. These modifications could have an influence on three main steps of the fungi's life cycle, *i.e.* vegetative development, sexual reproduction and ascocarp maturation. In the case of *A. vulneraria*, *F. ovina* and *R. canina*, our results indicate that plants species had an impact on the stage of vegetative development of the mycelium in soil. Interestingly, *T. vulgaris* was also qualified as a favorable species but no significant effect was detected on *T. melanosporum* mycelium concentration in soil. However, *T. melanosporum* often fruits among roots of *T. vulgaris*, where buffered abiotic conditions may favor the development of the ascocarp (Callot *et al.*, 1999; Chatin 1869). Conducive effects of *T. vulgaris* could also be due to compounds emitted directly or through their specific microbial communities, such as antibacterial and antifungal compounds emitted by *Thymus spp.* (Karaman *et al.*, 2001; Bounatirou *et al.*, 2007) protecting the ascocarp during its long maturation period (Pacioni *et al.*, 2007). Deciphering

the nature of the interaction between AM plant species and ascocarp development requires further investigations, including spatial surveys on the field.

Does T. melanosporum affect AM plants?

In our comparative experiment, we did not evidence an ecophysiological response of AM plant species on nutrient concentrations at the species level. However, an overall species-independent pattern was observed with a negative effect on P uptake in presence of *T. melanosporum* only significant after two years of growth. In our experiment, plant species which favored *T. melanosporum* mycelium development in soil (i.e. *A. vulneraria*, *F. ovina* and *R. canina*) showed no nutritional depletion in inoculated mesocosms. In addition, *R. canina*, *A. odoratum* and *S. junceum* which we expected to be more affected by *T. melanosporum* (**Fig. 3b**) didn't show contrasted nutritional status when grown with *T. melanosporum*. For the moment, these results do not support the hypothesis of a direct parasitism of herbaceous plants by *T. melanosporum*, despite evidences of its presence (or close relatives) in or on AM plants roots (Plattner & Hall, 1995; *T. aestivum*, Gryndler *et al.*, 2014). The absence of striking effects may be due to the early stage of *T. melanosporum* mycelium development. Thus, symptoms of negative plant-fungal interactions in *T. melanosporum* truffle grounds typically arise only three or four years after planting, when the “brûlé” become visible. For instance, metabolic activities are known to change during truffle's life cycle (Ceccaroli *et al.*, 2011), and one may argue that changes in the intensity of plant-fungal interactions could occur at later stages before initiation of sexual reproduction.

An early effect of T. melanosporum on AM plant germination: toward the mechanisms underlying the brûlé?

In our study, the number of shoots of exogenous plants colonizing the mesocosms were significantly lower in *T. melanosporum* inoculated mesocosms than in non-inoculated ones (Table 3). This result suggests an effect of *T. melanosporum* on germination or early development of herbaceous germinations.

Biological mechanism triggering the formation of the brûlé by some Tuber species, especially *T. melanosporum* and *T. aestivum* has long attracted attention and the hypothesis of an

allopathic effect of truffle was first mooted back in 1564 (Ciccarello, 1564). Two critical phases of plant development can be affected by *T. melanosporum* conducting to a scarce vegetation zone, with 1) a negative effect on seed germination and 2) a negative effect on plant development. Previous laboratory experiments showed similar effect on seed germination and seedling development testing isolated chemical compounds (Angelini *et al.*, 2014) volatile organic compounds (Splivallo *et al.*, 2009; Pacioni *et al.*, 1991), or culture filtrates and aqueous extracts of Tuber ascocarps (Fasolo-Bonfante *et al.*, 1971; Montacchini & Caramiello-Lomagno, 1977). Mechanisms observed in laboratory conditions are often hardly transposable to the field but the observed phenomenon persisted in our mesocosm experiment.

Does *T. melanosporum* influence host development?

Under the Mediterranean climates, tree seedlings experience severe mortalities due to strong water limitations (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004). ECM symbiosis enhances plant survival and growth (Smith & Read 2008) and the inoculation of *T. melanosporum* for afforestation of Mediterranean sites nearly doubled survival of *Q. ilex* (Domínguez Núñez *et al.*, 2006). In our experiment *T. melanosporum* didn't enhanced *Q. ilex* development in height or basal circumference (Table 1). Both trait values were significantly lower in the inoculated treatment, contrary to former studies (Domínguez Núñez *et al.*, 2006; Domínguez Núñez *et al.*, 2006). Nevertheless, leaf dry matter content was significantly higher under the inoculation modality probably due to different resource allocations and traits related to *Q. ilex* photosynthesis capacities (chlorophyll concentration and maximum efficiency of photosynthesis) were improved when inoculated with *T. melanosporum*. Our results are in accordance with a study monitoring oaks plants (*Q. ilex* and *Q. faginea*) after out-planting, where *T. melanosporum* inoculation mainly enhanced P and N concentrations in leaves and water uptake (Domínguez Núñez *et al.*, 2006) as found for other ECM species (Smith & Read, 2008; Dickie *et al.*, 2002). Measured values of maximum efficiency of photosynthesis (0.75-0.76 Fv/Fm) were slightly under optimal values of 0.83 Fv/Fm (Maxwell & Johnson 2000), which could be due to a particularly dry spring in 2014 (80 mm rain cumulated from March to end of Juin, versus 124 and 309 mm in 2012 and 2013 respectively). Enhanced water uptake by the extended *T.*

melanosporum mycelium network could contribute to increased photosynthesis capacities of the inoculated seedling. However, whether this effect is specifically related to the specific action of *T. melanosporum* or general higher mycorrhizal colonization rate remains questionable. Final analyses of the mesocosms will enable estimation of total mycorrhizal roots colonization.

Does T. melanosporum mediate ECM-AM plant interactions?

We experimentally evidenced that *T. melanosporum* mediates plant – plant interactions that are beneficial to host nutrition during the early stage of its development: in non-inoculated mesocosms, the presence of AM tended to reduced N concentrations in *Q. ilex* leaves, whereas in the presence of *T. melanosporum*, the same plants increased N uptake by *Q. ilex* (Table 3; Fig. S2 b.) Interestingly, the three species (*A. vulneraria*, *F. ovina* and *R. canina*) which favored *T. melanosporum* development in soil were favorable for *Q. ilex* N concentrations (Table 3; Fig. S2), and a positive and significant correlation was observed between *T. melanosporum* mycelium concentration in soil and N concentrations in *Q. ilex* tissues. Furthermore, in presence of AM plants we measured a negative correlation between the basal circumference and height of *Q. ilex* and *T. melanosporum* mycelium concentration in soil. In other words, in presence of AM plants and *T. melanosporum*, *Q. ilex* showed better nutritional status with a lower above ground development observed on basal circumference and height. To better understand these interactions, our trait-based analysis has to be completed by measuring the below ground development and biomass of hosts and AM plants, and the nitrogen reservoir in soil, and host root systems.

To our knowledge, this result is the first to show the mediation of an indirect ECM-AM plant interaction by an ECM fungal species. The mechanisms and the involved biotic and abiotic factors remain unclear, and may include 1) an indirect effect of shifts in AM soil communities through *T. melanosporum* interaction with soil biota and 2) a shift in competition and N availability in soil. Assessing AM fungi communities associated to AM plants would be an interesting perspective to enlighten further mechanisms behind the facilitation of *T. melanosporum* development by non-ectomycorrhizal plant species and its effects on plant development (Figure 1 b.). Next step would also include the description of the bacterial

communities closely interacting with mycorrhizal fungus also qualified as helper organisms promoting mycorrhizal development (Garbaye, 1994; Bonfante & Anca, 2009; Frey-Klett *et al.*, 2007).

Conclusion

Our study aimed at experimentally evaluating the ability of co-occurring plants of different mutualistic models (VA vs. EC) to interact through microbial driven mechanisms. Here we showed that AM plant diversity in truffle grounds encompasses species which have the ability to promote both 1) the development of an ECM fungal symbiont and 2) the nutrition status of its host, through an indirect plant-plant positive interaction. Corollary, our results provide ecological support to a large corpus of empirical practices that selectively pay a particularly attention to AM plant species considered by truffle growers as auxiliaries of *T. melanosporum* development. Altogether, these results pave the way to further studies considering truffle grounds as multipartite systems where the combined roles of mycobionts and phytobionts from different mutualistic models shape the accomplishment of *T. melanosporum* biological cycle.

Acknowledgement

We warmly acknowledge Pierre Bernadach who kindly allowed us to collect soil in his truffle grounds. We are particularly thankful to Thierry Mathieu and David Degueldre who helped us to settle up the experiment, and Catherine Roumet, Jean-Marc Ourcival and Michael Staudt for helpful advises. Long-term monitoring wouldn't have been possible without the enthusiastic investment of Camille Cros and Benjamin Sembeil.

References

- Anderson IC, Genney DR, Alexander IJ. 2014.** Fine-scale diversity and distribution of ectomycorrhizal fungal mycelium in a Scots pine forest. *New Phytologist* **201**: 1423–1430.
- Angelini P, Tirillini B, Properzi A, Rol C, Venanzoni R. 2014.** Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber* spp. methanolic extracts. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **0**: 1–10.

- Aumeeruddy-Thomas Y, Therville C, Lemarchand C, Lauriac A, Richard F. 2012.** Resilience of sweet chestnut and truffle holm-oak rural forests in Languedoc-Roussillon, France: Roles of social-ecological legacies, domestication, and innovations. *Ecology and Society* **17**.
- Benjamini Y, Hochberg Y. 1995.** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**: 289–300.
- Bever JD. 2002.** Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**: 2595–2601.
- Bever JD, Dickie IA, Facelli E, Facelli JM, Klironomos J, Moora M, Rillig MC, Stock WD, Tibbett M, Zobel M. 2010.** Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 468–478.
- Bever JD, Platt TG, Morton ER. 2012.** Microbial Population and Community Dynamics on Plant Roots and Their Feedbacks on Plant Communities. *Annual review of microbiology* **66**: 265–283.
- Bonfante P, Anca I-A. 2009.** Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annual Review of Microbiology* **63**: 363–383.
- Bosredon de, A. 1887.** Manuel du trufficulteur. Re-éditions, Lacour, Nîmes, France.
- Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN, Neffati M, Costa MM, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. 2007.** Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry* **105**: 146–155.
- Brundrett MC. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**: 275–304.
- Callot G. 1999.** *La truffe, la terre, la vie*. Editions Quae.
- Çavaş T, Könen S. 2007.** Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* **22**: 263–268.

- Ceccaroli P, Buffalini M, Saltarelli R, Barbieri E, Polidori E, Ottonello S, Kohler A, Tisserant E, Martin F, Stocchi V. 2011.** Genomic profiling of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* 189: 751–764.
- Chatin, A. 1869.** La Truffe, étude des conditions générales de la production truffière. Ed. Buchard-Husard, Paris. Re-éditions, Lacour, Nîmes, France.
- Ciccarello da Bevagna, Alfonso. 1564.** De Tuberibus. Padova.
- Cipollini D, Rigsby CM, Barto EK. 2012.** Microbes as targets and mediators of allelopathy in plants. *Journal of Chemical Ecology* 38: 714–727.
- Dickie IA, Koide RT, Steiner KC. 2002.** Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition, and growth of quercus rubra seedlings. *Ecological Monographs* 72: 505–521.
- Domínguez Núñez JA, Serrano JS, Barreal JAR, González JAS de O. 2006.** The influence of mycorrhization with *Tuber melanosporum* in the afforestation of a Mediterranean site with *Quercus ilex* and *Quercus faginea*. *Forest Ecology and Management* 231: 226–233.
- Edwards WM, Triplett GB, Kramer RM. 1980.** A watershed study of glyphosate transport in Runoff1. *Journal of Environment Quality* 9: 661.
- Fasolo-Bonfante, P., Fontana, A., Montacchini, F., 1971.** Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum* I. Dimostrazione di un effetto fitotossico. *Allionia* 17, 48–53.
- Frey-Klett P, Garbaye J, Tarkka M. 2007.** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22–36.
- Garbaye J. 1994.** Tansley review no. 76 helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New phytologist* 128: 197–210.
- Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ. 2006.** Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* 170: 381–390.

Gómez-Aparicio L, Zamora R, Gómez JM, Hódar JA, Castro J, Baraza E. 2004. Applying plant facilitation to forest restoration: a meta-analysis of the use of shrubs as nurse plants. *Ecological Applications* **14**: 1128–1138.

González-Armada B, Miguel AM, Cavello RY. 2010. Ectomycorrhizae and vascular plants growing in brûlés as indicators of below and above ground microecology of black truffle production areas in Navarra (Northern Spain). *Biodiversity and Conservation* **19**: 3861–3891.

Gryndler M, Černá L, Bukovská P, Hršelová H, Jansa J. 2014. *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza* **24**: 603–610.

Gryndler M, Trilčová J, Hršelová H, Streiblová E, Gryndlerová H, Jansa J. 2012. *Tuber aestivum* Vittad. mycelium quantified: advantages and limitations of a qPCR approach. *Mycorrhiza* **23**: 341–348.

Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* **21**: 433–438.

Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72.

Karaman S, Digrak M, Ravid U, Ilcim A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* **76**: 183–186.

Mamoun M, Oliver JM. 1997. Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum*: effect of soil disinfestation and co-culture with *Festuca ovina*. *Plant and soil* **188**: 221–226.

Martegoute J-C, Courdeau A. 2002. *Plantes des Causses et des truffières*. Périgueux (4 et 6 Pl. Francheville, 24016): Fédération départementale des trufficulteurs du Périgord.

Maxwell K, Johnson GN. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659–668.

Montacchini, F., & Caramiello Lomagno, R.,1977. Studi sull'ecologia del *Tuber melanosporum*. II. Azione inibitrice su specie erbacee della flora spontanea. *Allionia*, 22, 81-85.

Negga R, Stuart JA, Machen ML, Salva J, Lizek AJ, Richardson SJ, Osborne AS, Mirallas O, McVey KA, Fitsanakis VA. 2011. Exposure to glyphosate- and/or Mn/Zn-Ethylene-bis-Dithiocarbamate-Containing pesticides leads to degeneration of γ -Aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicity Research* **21**: 281–290.

Olivera A, Fischer CR, Bonet JA, Aragón JM de, Oliach D, Colinas C. 2011. Weed management and irrigation are key treatments in emerging black truffle (*Tuber melanosporum*) cultivation. *New Forests* **42**: 227–239.

Olivier J-M, Savignac J-C, Sourzat P. 2012. *Truffe et trufficulture*. Périgueux: Editions Fanlac.

Pacioni G. 1991. Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycological Research* **95**: 1355–1358.

Pacioni G, Leonardi M, Aimola P, Ragnelli AM, Rubini A, Paolocci F. 2007. Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber* ascomata. *Mycological Research* **111**: 1450–1460.

Parladé J, Varga H, Miguel AM, Sáez R, Pera J. 2013. Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. *Mycorrhiza* **23**: 99–106.

Plattner I, Hall IR. 1995. Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological Research* **99**: 1367–1370.

Van der Putten WH, Bardgett RD, Bever JD, Bezemer TM, Casper BB, Fukami T, Kardol P, Klironomos JN, Kulmatiski A, Schweitzer JA, et al. 2013. Plant–soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* **101**: 265–276.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Silla F, González-Gil A, González-Molina ME, Mediavilla S, Escudero A. 2010. Estimation of chlorophyll in *Quercus* leaves using a portable chlorophyll meter: effects of species and leaf age. *Annals of Forest Science* **67**: 108–108.

Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition*. Amsterdam; Boston: Academic Press.

Splivallo R, Fischer U, Gobel C, Feussner I, Karlovsky P. 2009. Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *PLANT PHYSIOLOGY* **150**: 2018–2029.

Splivallo R, Novero M, Berteà CM, Bossi S, Bonfante P. 2007. Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **175**: 417–424.

Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M. 2012. Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology* **80**: 1–8.

Suz LM, Martín MP, Oliach D, Fischer CR, Colinas C. 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*–*Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiology Letters* **285**: 72–78.

Taschen E, Sauve M, Taudière A, Parlade J, Selosse M-A, Richard F. 2014. Whose truffle is this? Distribution patterns of ectomycorrhizal fungal diversity in *Tuber melanosporum* brûlés developed in multi-host Mediterranean plant communities. *Environmental Microbiology*: n/a–n/a.

Taschen E., Rousset F., Sauve M., Urban A., Benoit L., Dubois M.-P., Richard F., Selosse, M.-A., in preparation. Mediterranean *Tuber melanosporum* populations revealed high inbreeding and strong isolation by distance, with limited impact of on-going domestication. *In preparation*.

Supplemental data

Table S1. Complemental list of plant genus cited by truffle growers as indicated by numbers in the graph of **Figure 3**.

1	<i>Atropa</i>	<i>Cichorium</i>	<i>Convolvulus</i>	<i>Fabaceae</i>	<i>Filicophyta</i>	<i>Foeniculum</i>			
	<i>Hedera</i>	<i>Heliotropia</i>	<i>Medicago</i>	<i>Osyris</i>	<i>Rumex</i>	<i>Solanum</i>	<i>Bugrane</i>		
	<i>Equisetum</i>								
2	<i>Clematis</i>		<i>Rubia</i>	<i>Smilax</i>	<i>Viburnum</i>				
3	<i>Arenaria</i>	<i>Asparagus</i>	<i>Bryophyta</i>	<i>Coriaria</i>	<i>Crataegus</i>	<i>Dorycnium</i>			
	<i>Epipactis</i>	<i>Hypericum</i>	<i>Limodora</i>	<i>Myosotis</i>	<i>Orchidaceae</i>	<i>Petrorrhagia</i>			
	<i>Pinus</i>	<i>Plantago</i>	<i>Rhamnus</i>	<i>Setaria</i>	<i>Carex</i>	<i>Taraxacum</i>	<i>Chondrilla</i>		
4	<i>Brachypodium</i>	<i>Marrubium</i>	<i>Origanum</i>	<i>Oxalis</i>	<i>Phillyrea</i>				
5	<i>Bromus</i>	<i>Hieracium</i>	<i>Pistacia</i>						
6	<i>Arbutus</i>	<i>Prunus</i>	<i>Sonchus</i>						

Figure S1. Carbon (a), nitrogen (b), and phosphorus (c) concentrations in leaves of AM plant species measured in spring 2014 on *A. odoratum* (Aodo), *A. vulneraria* (Avul), *F. ovina* (Fovi), *R. canina* (Rcan), *S. junceum* (Sjun), *T. vulgaris* (Tvul)) grown with inoculated (+) and non-inoculated (-) *Q. ilex* seedlings.

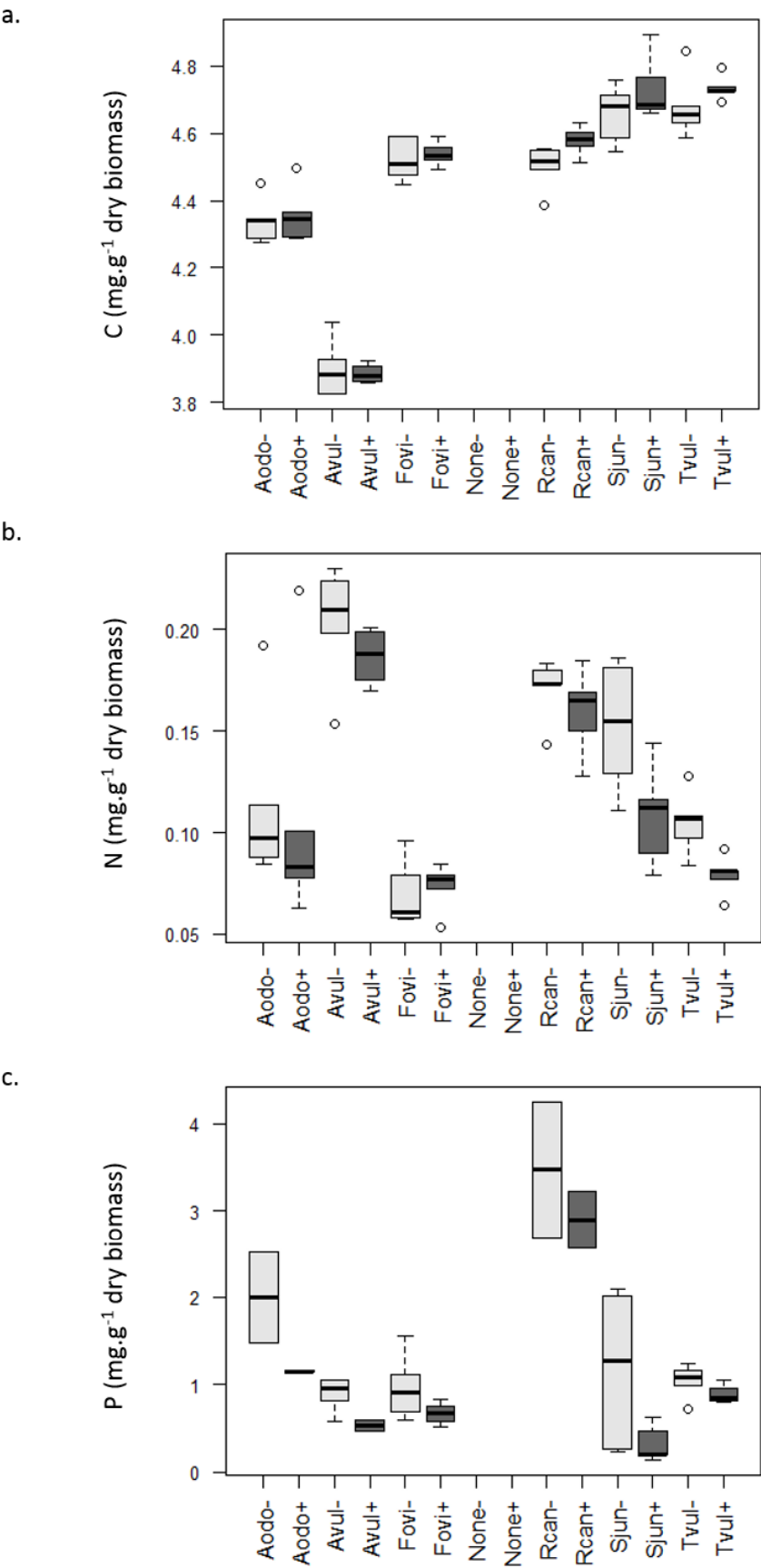
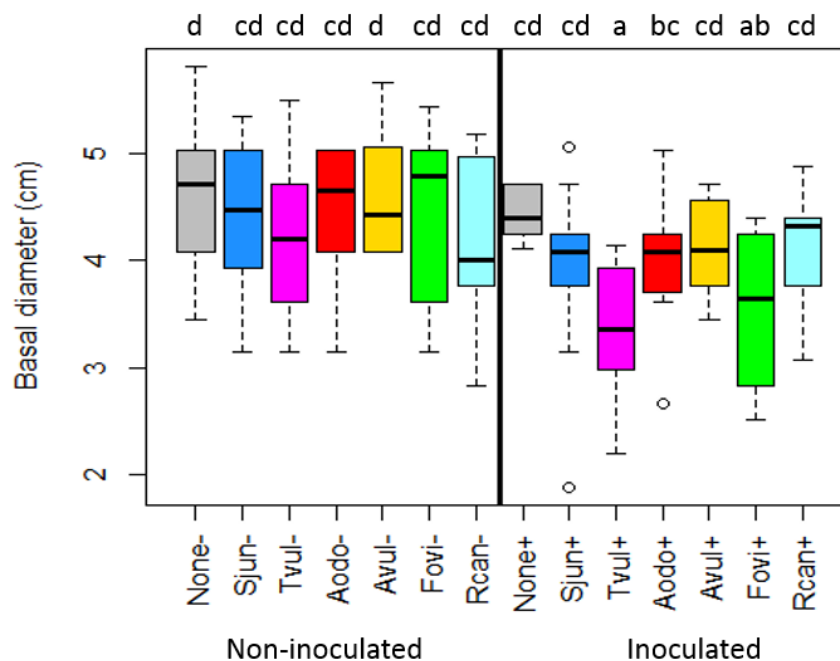
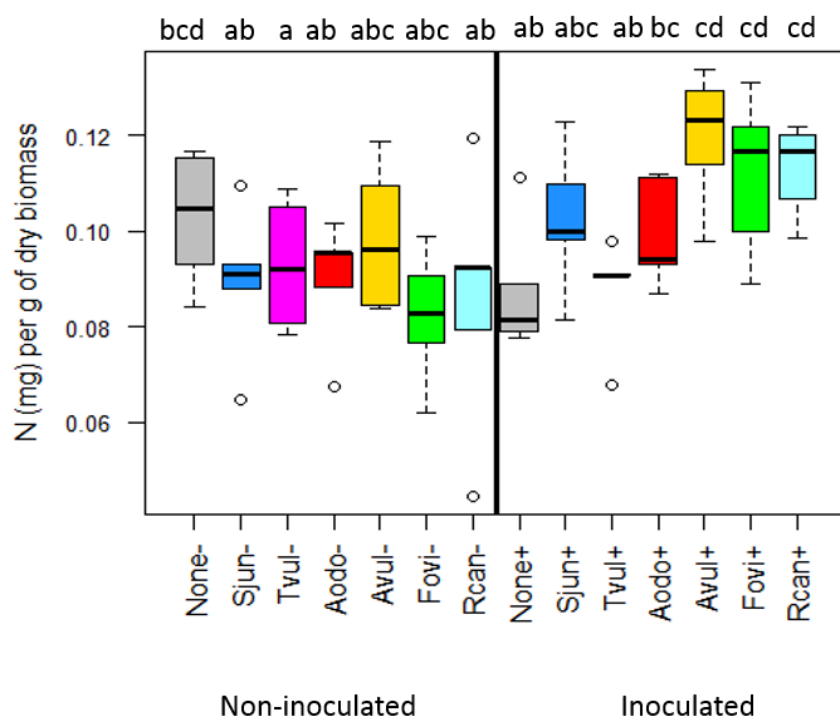


Figure S2. (a) Basal diameter and (b) nitrogen concentration in leaves of *Q. ilex* seedlings measured in spring 2014, growing either alone (None) or with *S. junceum* (Sjun), *T. vulgaris* (Tvul), *A. odoratum* (Aodo), *A. vulneraria* (Avul), *F. ovina* (Fovi) and *R. canina* (Rcan). Panel one left and on right refer to non-inoculated and inoculated mesocosms, respectively. Letters indicate groups that are significantly different at the level of 95% (pairwise comparisons between groups based on Student test with FDR correction).

a.



b.



Chapitre III Eléments de la biologie reproductive de la Truffe

Eléments de la biologie reproductive de la Truffe à travers la structure génétique de ses populations en truffières spontanées et plantées

Article 3: « *Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility?* ». Commentaire publié dans le *New Phytologist*, 199(1), 10-13. Juillet, 2013.

Article 4: « *Mediterranean Tuber melanosporum populations revealed high inbreeding and strong isolation by distance, with limited impact of on-going domestication.* » Article en préparation.

Résumé en français

Le premier Article (3) de ce chapitre commente la publication de Murat *et al.* (2013), qui analyse la structure génétique de la Truffe en plantation à travers l'échantillonnage 1) de la production d'ascocarpes sur six arbres, dont 3 ont été suivis sur deux ans sur une première parcelle, et 2) des ectomycorhizes autour de quatre arbres sur une seconde parcelle, par un seul échantillonnage. Cet article montre un fort patron d'isolation par la distance ainsi qu'une faible persistance sur deux saisons consécutives des génotypes maternels (seule la gléba des ascocarpes est analysée) ; de plus, ces génotypes semblent agrégés par type sexuels (*mating-type*, MT), c'est-à-dire que les génotypes voisins ont souvent le même type sexuel, ce qui pose la question de l'origine (voire d'un rôle limitant) de la contribution paternelle.

L'**Article 3** discute les mécanismes qui pourraient expliquer cette apparente ségrégation spatiale des types sexuels, en avançant l'hypothèse du recrutement du locus du type sexuel dans des processus de reconnaissances végétatives permettant la reconnaissance entre individus génétiquement proches (sélection de parentèle), comme cela existe chez certains Ascomycètes. De plus, puisque deux types sexuels opposés sont nécessaires pour la reproduction, il semblerait que ce processus pourrait être un frein à la reproduction. Si l'on considère le coût énergétique élevé, et le risque de la perte de combinaisons génétiques adaptées de la reproduction sexuée, la liaison de la reconnaissance végétative au locus régulant l'appariement sexuel pourrait ainsi être un mécanisme de limitation de la reproduction sexuée de ce champignon hétérothallique.

Dans les deux analyses de génétique des populations de Truffe précédentes, seuls les génotypes du même type sexuel que les génotypes maternels formant les ascocarpes sont trouvés au niveau des ectomycorhizes (Murat *et al.*, 2013 ; Rubini *et al.*, 2011a), sans trace aucune des potentiels pères. Néanmoins, de nombreux brûlés sont productifs malgré la présence d'un seul MT au niveau de la gléba des ascocarpes (Linde & Selmes, 2012), ce qui pose la question de la provenance des génotypes paternels. La biologie de la reproduction des ascomycètes autorise la fécondation (de façon non-exclusive) selon les espèces par des spores, des hyphes indifférenciés, ou des hyphes différenciés (en spermatocystes). Plusieurs possibilités sont énoncées dans l'**Article 3**, proposant la présence locale des génotypes paternels issus des spores présents dans le sol ou l'existence de micro-individus présents sur des hôtes moins attendus comme les plantes AM. De plus, la présence de tapis de conidies (spores végétatives) en surface a été mise en évidence pour un nombre important de Pezizales (Healy *et al.*, 2012), et plus spécifiquement, chez plusieurs espèces de *Tuber* (Urban *et al.*, 2004), ce qui ouvre l'hypothèse d'un flux de gamètes via la dispersion aérienne de ces conidies (appelées spermaties si elles servent de gamètes). Le dernier point abordé dans l'**Article 3** discute les possibles conséquences du processus de proto-domestication sur la diversité et la structure génétique des populations de Truffe.

Ainsi, l'**Article 3** ouvre des perspectives de recherches largement abordées dans l'**Article 4**.

Dans cet **Article 4**, à travers un large échantillonnage effectué à l'échelle des brûlés, des truffières et d'une région (Languedoc-Roussillon), et incluant des ascocarpes, des ectomycorhizes et des racines de plantes non-ectomycorhiziennes (1434 échantillons ; **Table 1** de l'**Article 4**), les questions suivantes ont été abordées :

- 1) La Truffe est-elle présente sur les racines de plantes non-ectomycorhiziennes ?
- 2) Quelle est la diversité génétique des génotypes maternels et paternels présents sur les brûlés, leur persistance dans le temps, et peut-on confirmer statistiquement la présence d'une ségrégation des types - sexuels du côté maternel ? Et quels sont les individus qui s'apparient (taux de consanguinité) ?
- 3) Quelle est la diversité génétique des truffières et quel est le patron d'isolation par la distance à l'échelle des truffières (d'environ un hectare) ?
- 4) Et enfin, y a-t-il des différences entre la diversité génétique des truffières spontanées et plantées à l'échelle d'une région, et plus globalement, entre les deux compartiments (spontané et planté) sur les points 2-3 cités ci-dessus ?

Au total, 961 échantillons ont été génotypés sur 13 marqueurs microsatellites (Murat *et al.*, 2011) et leur type sexuel a été identifié en utilisant les amorces spécifiques de Rubini *et al.*, (2011). A l'échelle des brûlés (**Table 1** de l'**Article 4**), en plus de l'extraction simple de la gléba donnant accès au génotype maternel, une extraction spécifique des spores a été effectuée, donnant, par soustraction, accès aux génotypes paternels.

De plus, en utilisant des amorces spécifiques à *T. melanosporum* sur 506 fragments racinaires, sa présence a été identifiée sur l'ensemble des 45 espèces de plantes non-ectomycorhiziennes étudiées (pour la plupart des espèces à mycorhizes arbusculaires), soit 44.5% des racines analysées, avec persistance du signal après désinfection de la surface racinaire. La présence de la Truffe a aussi été vérifiée par séquençage de l'ITS sur une sous-fraction de ces échantillons, révélant des séquences lisibles (sans amplifications multiples) pour la Truffe sur 27% des fragments analysés, ainsi que la présence de 9 autres taxons ectomycorhiziens (**Table S4c** de l'**Article 4**). Ces résultats confortent l'hypothèse de possibles interactions endophytiques de la Truffe, et plus globalement, de certaines espèces ectomycorhiziennes, notamment *Sebacina incrustans*, observée sur deux de nos échantillons et pour laquelle l'endophytisme avait déjà été observé par Selosse *et al.* (2008).

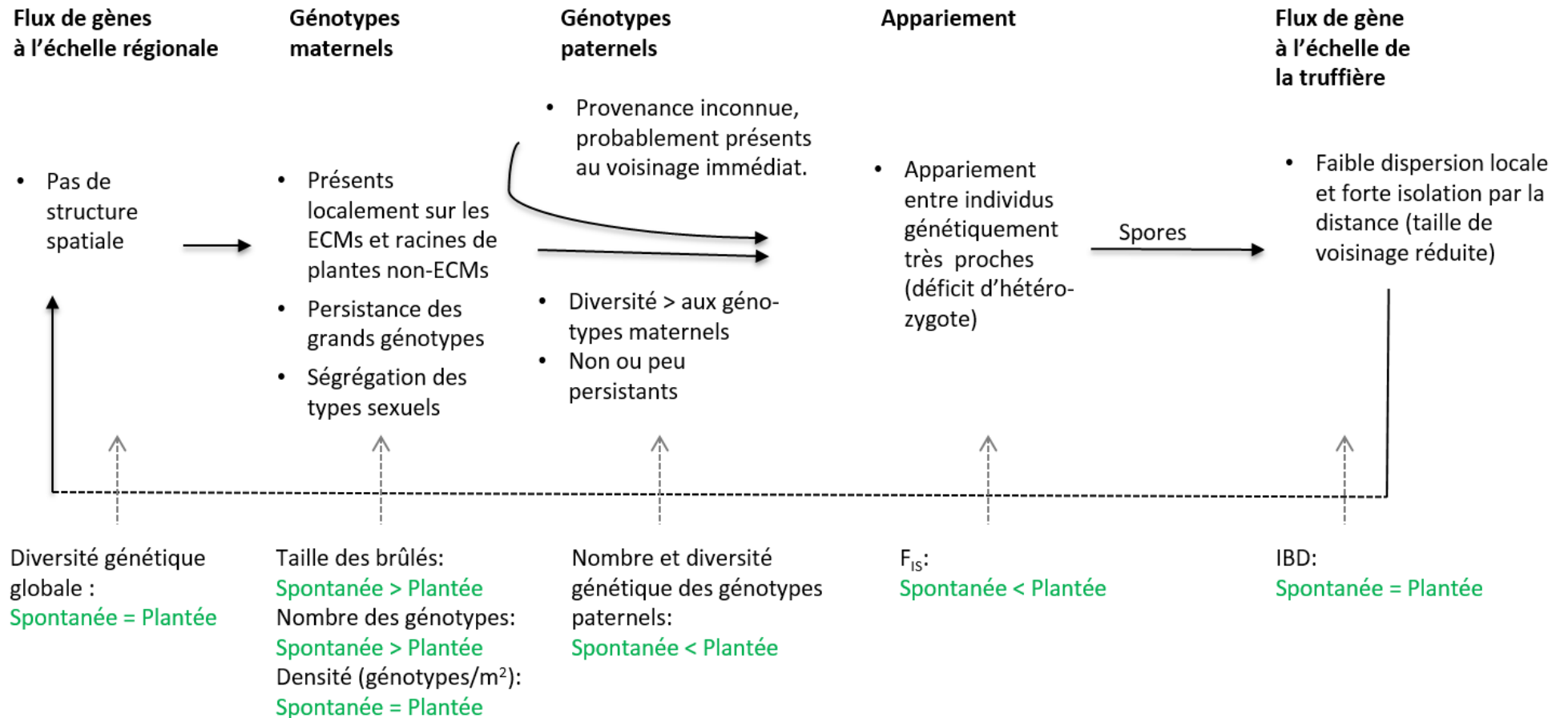
A l'échelle du brûlé, nos analyses montrent que les génotypes maternels ont tendance à être plus nombreux et moins productifs sur les brûlés spontanés que sur les brûlés de plantations, où le génotype dominant comprend de 65 à 93 % des ascocarpes fructifiants du brûlé (*versus* 18 à 34 % en spontané ; voir la diversité clonale : **Table 2** de l'**Article 4**). Cependant, rapportée à la surface, la densité des génotypes reste semblable (de l'ordre de 0,15 m²), car les brûlés spontanés tendent aussi à être plus grands. Alors que certains génotypes maternels persistent d'une année sur l'autre (de 21 à 37% des génotypes maternels à l'échelle des truffières ; **Table 2 et 3** de l'**Article 4**), avec un biais en faveur des génotypes de grande taille et très producteurs, les génotypes paternels sont fugaces, généralement impliqués dans la formation d'une seule fructification, sans persistance dans le temps (les rares exceptions concernent des génotypes non soutenus comme étant issus d'un seul événement reproducteur; P_{sex} dans la **Table S2** de l'**Article 4**). L'analyse des génotypes présents sur les ectomycorhizes et un sous-échantillonnage de racines non-ectomycorhiziennes confirment leur appartenance aux génotypes maternels des ascocarpes alentour (**Fig. 2** de l'**Article 4**), et ne donnent

aucune trace de la localisation végétative des génotypes paternels, même par l'échantillonnage à plus fine échelle à différentes saisons (printemps et été).

En s'intéressant de plus près à l'hétérozygotie des zygotes, les résultats montrent un fort déficit d'hétérozygotes dans les deux compartiments, spontanés et plantés. Cependant, sur les brûlés plantés les valeurs de Fis (consanguinités) sont moins extrêmes (**Table 2** de l'**Article 4**), et les génotypes paternels montrent une plus grande diversité génétique, avec de nombreux allèles supplémentaires qu'on ne retrouve pas parmi les génotypes maternels. Il est tentant de spéculer que ces différences puissent résulter des pratiques de réensemencement des truffières en plantations, qui n'ont néanmoins pas été détaillées ici et mériteraient de plus amples investigations. Sur l'ensemble des truffières étudiées, l'analyse statistique des génotypes maternels montre une agrégation significative des génotypes en fonction du type sexuel, et un fort patron d'isolation par la distance, en truffières spontanées et cultivées (**Fig. 3**, **Table 3** de l'**Article 4**). Les très faibles flux génétiques observés à l'échelle de la parcelle, alliés à la forte consanguinité des individus qui s'apparient, ne vont pas dans le sens d'une dispersion aérienne de spermaties, mais favorisent plutôt celle de pères très locaux, petits et/ou fugaces, par exemple issus de la banque de spores du sol. Ces génotypes sont probablement fortement apparentés, car issus de la reproduction des génotypes maternels présents ou des mêmes ascocarpes apportés par les fèces impliqués dans leur dispersion. La fécondation renforcerait ainsi le fort patron d'isolation par la distance observé sur les brûlés, peut-être en s'additionnant à la sélection de parentèle explicitée plus tôt si elle existe.

Concernant la comparaison planté / spontané à l'échelle des truffières, mise à part la taille des brûlés (plus variable et souvent plus grande dans les truffières spontanées ; **Table 3** de l'**Article 4** ; **Fig. S2**), montre peu de différences entre les compartiments (**Table 3** de l'**Article 4**). L'échelle régionale ne révèle aucune différence entre la diversité génétique des compartiments spontanés et plantés, ni par analyse de l'isolation par la distance (**Fig. 4** de l'**Article 4**). Les pratiques d'inoculation de l'homme ainsi que la dispersion à longue distance par d'autres grands mammifères (Génard *et al.*, 1988) homogénéisent probablement la structure génétique de la Truffe, qui, à ce stade de la tentative de domestication ne subit pas encore d'isolement ou de goulot d'étranglement génétique du compartiment géré par l'homme.

Figure 13. Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'Article 4.



Article 3



Commentary

Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility?

The black Perigord truffle (*Tuber melanosporum*) is recognized worldwide as an icon of European gastronomy. Its edible fruitbody is a hypogeous fleshy structure producing meiospores (Fig. 1). This ascomycete fungus is ectomycorrhizal, that is, symbiotically associates with tree roots. The demand for this highly appreciated delicacy and the decrease of its production over the twentieth century (Savignac *et al.*, 2012) have fuelled intense efforts at its cultivation, and at sequencing its genome (Martin *et al.*, 2010). In this issue of *New Phytologist*, Murat *et al.* (pp. 176–187) analyze *T. melanosporum* population genetics in two truffle plantations. They reveal genotypes extending over a few meters, displaying a strong genetic structure at fine scale, with a pattern of isolation-by-distance within the plantation, and a striking spatial segregation of genotypes according to their mating type.

“Dwarf males” exist in animal and plant species, such as dioecious mosses ... in truffles, their existence remains an appealing speculation.’

Tuber melanosporum is heterothallic: mating can only occur between haploid cells of different mating types, that is, carrying different alleles at the MAT locus (Billiard *et al.*, 2012). In ascomycetes such as *T. melanosporum*, vegetative hyphae are haploid, and fruiting first requires mating (Fig. 1). In fact, marker segregation has been observed when extracting DNA from meiospores in *T. melanosporum*, confirming that same-clone mating is prevented (Paolocci *et al.*, 2006; Riccioni *et al.*, 2008). Truffle flesh, from which most if not all DNA is extracted by standard protocols, arises only from the female parent that builds and feeds the fruitbody. The male genotype can be deduced, by difference, from the sporangial genotype (Rubini *et al.*, 2011).

Spatial segregation of mating types

Murat *et al.* observed that spatially close individuals differing in their genotypes, according to microsatellite markers, carry the same

mating type. Rubini *et al.* (2011) observed such spatial segregation, and showed that it emerged secondarily: on each nursery-grown seedling, ectomycorrhizas from multiple individuals with different mating types initially co-occurred, and the dominance of mycelia carrying the same mating type emerged after several months. Such spatial segregation may be due to competitive exclusion between different genotypes, with use of the MAT locus as a marker for self-recognition, probably in addition to other polymorphic loci.

Although the MAT locus is rarely used as a marker for self-recognition in fungi, in *Neurospora crassa*, *Sordaria brevicollis*, *Ascobolus stercorarius* and *A. heterothallicus* the MAT locus is one of the loci controlling vegetative incompatibility (Glass *et al.*, 2000). Vegetative incompatibility is a common phenomenon in filamentous fungi that often results in death of the hyphal cells that have fused between individuals carrying different alleles at the loci involved in self-recognition (Glass *et al.*, 2000). Vegetative incompatibility is thought to protect resources within hyphae from exploitation by non-kin (Debets & Griffiths, 1998), whereas kin cooperate by sharing space and resources. This is selected for because the allele present in an individual controlling for altruism towards related individuals is often present in these related individuals: the allele controlling altruism therefore benefits from the altruism for its transmission to the next generation (Hamilton, 1964). The loci controlling vegetative incompatibility often display high degrees of polymorphism and even trans-specific polymorphism (Debets & Griffiths, 1998; Wu *et al.*, 1998), both of which are footprints of balancing selection expected at markers used for kin recognition. Competitive exclusion of non-kin is expected in fungi, and particularly in symbiotic fungi that would benefit from monopolizing the host root system, and in fact, vegetative incompatibility has been reported in plant parasites (López-Villavicencio *et al.*, 2011) and for ectomycorrhizal basidiomycetes (Worrall, 1997). Competitive exclusion of non-kin would have further consequences: fewer genetic conflicts are expected in this case on a root system, due to kin selection among genets (Buckling & Brockhurst, 2008), which should lead to more cooperative behaviors, and thereby to more benefits for the symbiotic association, including the tree – an intriguing prediction that deserves testing.

Why would selection recruit the MAT locus for vegetative incompatibility? Vegetative incompatibility typically involves multiple, non-homologous loci, which increases the precision of kin recognition (Glass *et al.*, 2000), and recruiting MAT would increase the number of discriminating loci. However, the MAT locus is biallelic in ascomycetes (Billiard *et al.*, 2012), and thus poorly efficient for kin recognition. The coupling of sexual and vegetative incompatibility furthermore complicates mating, where cell fusion occurs between two *different* mating types, while vegetative fusion requires *identical* alleles at the vegetative incompatibility loci. Developmental switch must then evolve to

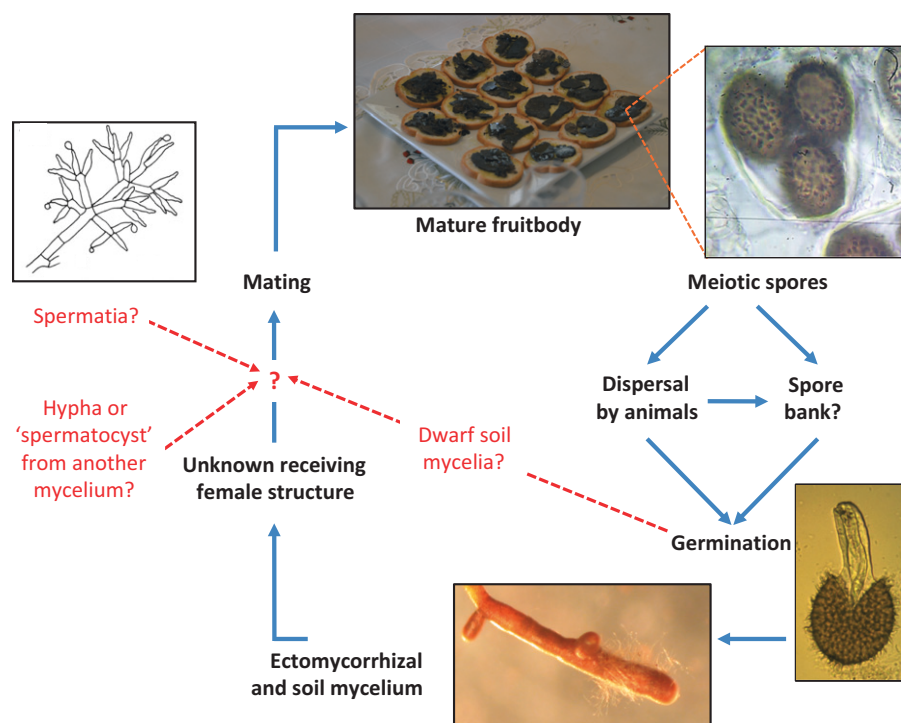


Fig. 1 The life cycle of the black truffle, *Tuber melanosporum*. Three hypotheses for the paternal contribution to mating are depicted in red (see text for description). Spermatia are reproduced with permission from Urban *et al.* (2004; putative *T. borchii* spermatia are represented, since no *T. melanosporum* spermatia have been observed so far); pictures of mature fruitbodies and germination were kindly prepared by Fabien Garces and Annie Guillen, and François Le Tacon photographed the mycorrhiza.

differentiate the compatibility at the sexual vs vegetative stages, with changes in gene expression, as described in *Neurospora crassa* (Shiu & Glass, 1999). One possible evolutionary explanation for the link between mating type and vegetative incompatibility may be that the resulting spatial segregation decreases the probability that compatible cells meet and therefore lowers the odds of mating; this is beneficial under the assumption that sex is costly (Otto & Lenormand, 2002). The best strategy for reproduction is indeed the clonal propagation of the fittest allelic combinations, with only some rare recombination events for purging deleterious mutations and producing new, possibly beneficial, allelic combinations. If a link between vegetative incompatibility and mating type evolved to avoid 'sexual harassment', this would be bad news for truffle production!

Looking for a father

However, avoiding sexual harassment may not be simple: the steps toward truffle fruitbodies remain unknown (Fig. 1), and as recognized by Murat *et al.*, we ignore what structure plays the role of the male partner. We therefore ignore whether gamete limitation actually occurs in truffle grounds. In fact, Linde & Selmes (2012) found no difference in fruitbody production between root systems displaying a single vs both mating types, and Murat *et al.* did find fruitbodies within large areas dominated by a single mating type.

In related ascomycetes, the male partner can produce a differentiated hyphal structure, an undifferentiated hypha, or a passively mobile cell, called a 'microconidium', or more appropriately a spermatium (Fig. 1). In this case, dispersal of spermatia may alleviate gamete limitation. Urban *et al.* (2004) and Healy *et al.* (2012) reported occurrence of candidate spermatia in ectomycorrhizal Pezizales and *Tuber* spp., whose failures to germinate on

sterile media or form ectomycorrhizas support a role of spermatia. Their small size (5 µm in diameter), thin cell walls and lack of reserves are unusual features for asexual multiplication. If spermatia were described in *T. melanosporum*, their dispersal range would be of interest: indeed, Murat *et al.* and Rubini *et al.* (2011) did not identify the males in the plantations, suggesting a migration from quite far.

Alternatively, mating may require close contact, either because spermatia do not disperse, or because direct hyphal contact is required (Fig. 1). But even this does not necessarily imply gamete limitation. Indeed, PCR amplifications from soil sometimes detect both mating types, as reported by Murat *et al.* and Rubini *et al.* (2011). Such DNA may issue from the spore bank expected for hypogeous fruitbodies, due to specimens not removed by dispersers (Grubisha *et al.*, 2007; Fig. 1). However, spore DNA is notoriously difficult to extract: for example, DNA extracted from fruitbodies reveals only maternal alleles and a single mating type. Instead, very small mycelia, attached to a few roots, or even nonmycorrhizal germinations, may exist and act as males (Douhan *et al.*, 2011). They cannot act as female, since they would not have enough resources to sustain fruitbody growth. 'Dwarf males' (Fig. 1) exist in animal and plant species, such as dioecious mosses (Hedenäs & Bisang, 2011); in truffles, their existence remains an appealing speculation.

A modern protodomestication

We thus do not control truffle reproduction, and ignore whether some gamete limitation occurs. This fits the definition of protodomestication, where the harvest is enhanced by empirical treatments favoring establishment and persistence (without control of reproduction, which is the hallmark of a true domestication).

Protodomestication is a difficult step as long as the biology of the target species remains unknown, during which some practices can slow down the emergence of interesting traits. In wheat and barley, for example, archaeological data show that the emergence of grain indehiscence, a major trait that allows the harvesting of all mature seeds, took more than one millennium (Tanno & Willcox, 2006). This is far more than requested using modern selection. Facing wild populations where dehiscence is the rule to allow seed dispersal, early farmers ignored this possibility and harvested cereals before ripening to avoid seed loss (Tanno & Willcox, 2006), so that indehiscent mutants were only weakly selected for. Furthermore, selection for smaller grains for sowing vs larger ones for human feeding likely delayed the augmentation of grain size.

It is thus still preliminary to recommend practices for truffle producers and to comment about existing empirical methods. As highlighted by Murat *et al.*, European truffle producers often disseminate pieces of mature truffles to re-inoculate the soil in already established plantations. While this may increase population density and counter-act gamete limitation if any, the use of lower-quality fruitbodies for this purpose, to sell the best ones, may induce a huge genetic load for future generations. It may favor genetic traits determining low flavor and/or size, or even high sensitivity to pathogens. Similarly, the use of frozen truffles (M-A. Selse & E. Taschen, pers. obs.) found after the harvesting season, may select for slow maturing or late initiated truffles, maladapted to local conditions. The same applies to fruitbodies used for nursery inoculation.

Since inoculated plantations now produce >80% of the fruitbodies (Savignac *et al.*, 2012), their genetic quality becomes determinant for future production and inoculants. Truffle producers should avoid inadequate practices reminiscent of those of early cereal domestication; the antagonism between selling the best truffles immediately, and using some of them as inoculants to improve the truffle grounds in the long term should be explained.

Perspectives

Uncertainties about the truffle life cycle lead us to ancestral problems in the domestication process. This also calls for more studies of populations in natural vs planted stands, to check the impact of the ongoing protodomestication. *Tuber melanosporum* populations are mostly studied in plantations, where trees had been inoculated in nurseries, and where the observed patterns are partly of anthropogenic origin. 'Wild' populations should be compared for genetic diversity, strength of the spatial segregation of mating types and other loci, at various scales – although anthropic genetic disturbance has likely already occurred. The large diffusion of nursery-inoculated trees may have impacted *T. melanosporum* genetic structure at regional scales. Many empirical traditions typical of European truffle production (Savignac *et al.*, 2012) also await studies to validate them: for example no genetic study has so far rigorously validated the inoculation method by monitoring the persistence of the inoculants in the long term.

Population genetics of ectomycorrhizal ascomycetes remains too rarely investigated (Douhan *et al.*, 2011): Murat *et al.* and Rubini *et al.* (2011) have contributed to change this. The possibility,

already described, of accessing the male genotype raises exciting possibilities to unravel the range of male gene dispersal, the mate choice, and the nature of the male contribution (Fig. 1). Identifying the location of fathers, by increasing sample sizes and spatial scale of sampling, would also be enlightening. Last, many other ectomycorrhizal ascomycetes (Healy *et al.*, 2012) also await similar investigations.

Marc-André Selse^{1,2*}, Elisa Taschen² and Tatiana Giraud^{3,4}

¹Muséum national d'Histoire naturelle (UMR 7205 OSEB), CP50, 45 rue Buffon, F-75005, Paris, France;

²Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, CNRS UMR 5175, 1919 Route de Mende, F-34293, Montpellier Cedex 5, France;

³Ecologie, Systématique et Evolution, Université Paris-Sud, F-91405, Orsay Cedex, France;

⁴Ecologie, Systématique et Evolution, CNRS, F-91405, Orsay Cedex, France

(*Author for correspondence: tel +33 (0)4 67 61 32 30; email ma.selse@wanadoo.fr)

References

- Billiard S, Lopez-Villavicencio M, Hood ME, Giraud T. 2012. Sex, outcrossing and mating types – unsolved questions in fungi and in general. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 1020–1038.
- Buckling A, Brockhurst MA. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100: 484–488.
- Debets AJM, Griffiths AJF. 1998. Polymorphism of *het* genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research* 102: 1343–1349.
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selse M-A. 2011. Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biology* 115: 569–597.
- Glass N, Jacobson D, Shiu P. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annual Reviews of Genetics* 34: 165–186.
- Grubisha LC, Bergemann SE, Bruns TD. 2007. Host islands within the California Northern Channel Islands create fine-scale genetic structure in two sympatric species of the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Rhizopogon*. *Molecular Ecology* 16: 1811–1822.
- Hamilton WD. 1964. The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of Theoretical Biology* 7: 1–16.
- Healy RA, Smith ME, Bonito GM, Pfister DH, Ge ZW, Guevara GG, Williams G, Stafford K, Kumar L, Lee T *et al.* 2012. High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology* 22: 1717–1732.
- Hedenäs L, Bisang I. 2011. The overlooked dwarf males in mosses – unique among green land plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13: 121–135.
- Linde CC, Selmes H. 2012. Genetic diversity and mating type distribution of *Tuber melanosporum* and their significance to truffle cultivation in artificially planted truffières in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 6534–6539.
- López-Villavicencio M, Courjol F, Gibson AK, Hood ME, Jonot O, Shykoff JA, Giraud T. 2011. Competition, cooperation among kin and virulence in multiple infections. *Evolution* 65: 1357–1366.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R *et al.* 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–1038.
- Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C, Halkett F, Martin F, Paolocci F. 2013. Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated

- with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist* 199: 176–187.
- Otto SP, Lenormand T. 2002. Resolving the paradox of sex and recombination. *Nature Reviews Genetics* 3: 252–261.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S. 2006. Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2390–2393.
- Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F. 2008. *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist* 180: 466–478.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011. *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist* 189: 723–735.
- Savignac JC, Sourzat P, Olivier JM. 2012 *Truffe et trufficulture, 2nd edn*. Périgueux, France: Fanlac.
- Shiu PKT, Glass NL. 1999. Molecular characterization of *tol*, a mediator of mating-type-associated vegetative incompatibility in *Neurospora crassa*. *Genetics* 151: 545–555.
- Tanno K, Willcox G. 2006. How fast was wild wheat domesticated? *Science* 311: 1886.
- Urban A, Neuner-Plattner I, Krisai-Greilhuber I, Haselwandter K. 2004. Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. *Mycological Research* 108: 749–758.
- Worrall JJ. 1997. Somatic incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* 89: 24–36.
- Wu J, Saupe SJ, Glass NL. 1998. Evidence for balancing selection operating at the *het-c* heterokaryon incompatibility locus in a group of filamentous fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95: 12398–12403.
- Key words:** black Perigord truffle, ectomycorrhiza, fruitbodies, mating types, population genetics, protodomestication, *Tuber melanosporum*, vegetative incompatibility.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <25 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit **www.newphytologist.com** to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@ornl.gov)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit **www.newphytologist.com**

Article 4

Mediterranean *Tuber melanosporum* populations reveal high inbreeding and strong isolation by distance, with limited impact of on-going domestication.

TASCHEN E.^{1,2,°}, ROUSSET F.³, SAUVE M.¹, URBAN A.³, BENOIT L.^{1,4}, DUBOIS M.-P.¹, RICHARD F.¹, SELOSSE M.-A.²

¹ CEFE UMR 5175, CNRS - Université de Montpellier - Université Paul-Valéry Montpellier - EPHE – 1919 route de Mende, 34293 Montpellier, France.

² Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité (ISYEB - UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE), Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités, 57 rue Cuvier, CP50, 75005, Paris, France

³ Institut des Sciences de l'Évolution (UM2-CNRS), Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, CC 065, Montpellier, cedex 5 34095, France.

⁴ CIRAD UMR CBGP - Avenue du campus Agropolis, CS30016, 34988, Montpellier-sur-Lez.

° corresponding author

Summary

The truffle *Tuber melanosporum*, a haploid Ascomycota, forms ectomycorrhizae and is a self-sterile hermaphrodite: its meiospores mature in ascocarps supported by one (maternal) parent after fertilization by a second (paternal) parent. We investigate pending issues on *T. melanosporum* population biology: [1] the ability to colonize roots of non-ectomycorrhizal plants; [2] genetic spatial structure, to assess gene dispersal; [3] partners' assortment in ascocarps, to assess a possible male gametic gene flow; and, facing the development of plantations of inoculated trees, [4] the differentiation of planted *versus* spontaneous, uninoculated compartments. We analysed microsatellite polymorphism in 1453 samples collected in South-East France plantations and spontaneous sites. We report evidence for colonization of non-ectomycorrhizal plants, mainly by individuals maternal in nearby ascocarps, but the biology of this interaction remains unknown. We confirm a previously observed strong isolation by distance on brûlés, probably due to local deposition of spores from same ascocarp(s) by animal dispersers, and an important soil spore bank. Diploid ascocarps were highly inbred, supporting very limited spatial dispersal of paternal gametes. As previously reported, maternal mycelia form patches with identical mating types. Since paternal mycelia were not found on ectomycorrhizal or non-ectomycorrhizal roots, we hypothesize the contribution of germings from the spore bank. Finally, the comparison between spontaneous sites and plantations revealed no genetic difference, except a higher paternal genetic diversity and lower inbreeding at brûlé scale, perhaps due to the dispersal of ascocarp fragments on soil in plantation. Thus, the on-going domestication hitherto poorly impacted on *T. melanosporum* in South-East France.

Keywords: Dispersal; Domestication; Ectomycorrhizae; Endophytism; Hermaphroditism; Hypogeous fungi; Inbreeding; Isolation by distance

Introduction

Ectomycorrhizal Asco- and Basidiomycota, which associate with tree roots, have major roles in forest ecology and host nutrition (Smith & Read, 2008; van der Heijden *et al.*, 2015) and produce edible mushroom of economic interest (Zambonelli & Bonito, 2012). Population genetic of ECM species raised continuous interest over the two last decades but focused mainly on Basidiomycota (see Douhan *et al.*, 2007 for review). Although less frequent on roots, ECM Ascomycota are diverse, e.g. among Pezizomycota (Tedersoo *et al.*, 2006; Healy *et al.*, 2013). They attracted little population genetic studies, with exceptions of *Tuber* species (see below) and the putatively asexual *Coenococcum geophilum* (Wu *et al.*, 2005; Douhan *et al.*, 2007).

ECM Ascomycota have contrasting lifecycles as compared to Basidiomycota (Douhan *et al.*, 2011; Tacon *et al.*, 2015). Whereas Basidiomycota develop a mycelium (that forms ECM colonization and fruitbodies) after mating between nearby transient haplonts and are formally diploid, Pezizomycota are haploid over most of their lifecycle. Mating occurs within the fruitbody (also called ascocarp) formed by one or both parental haplont(s) (Guidot *et al.*, 2003; Douhan *et al.*, 2011; Billiard *et al.*, 2012; Fig. 1). Due to sexual incompatibilities, fertilization often requires two parents, and in Ascomycota this is controlled by bipolar incompatibility with two different mating types (MT; Billiard *et al.*, 2012). Fertilization mechanisms are extremely diverse in Ascomycota (Korf, 1973; Debuchy *et al.*, 2010; Selosse *et al.*, 2013), ranging from mycelial contact involving more or less specialized cells, to distant fertilization by way of passively mobile spermatia (Guidot *et al.*, 2003; e.g. in Pezizomycota Healy *et al.*, 2013). As a result, gene may not only be dispersed by meiotic spores (as in Basidiomycota), but also by gametes (Fig. 1).

The current study focuses on the economically and gastronomically important *T. melanosporum* that emerges as a model for population genetics (Tacon *et al.*, 2015). Recent studies partly invalidated the previous view that *T. melanosporum* has low genetic variability (Bertault *et al.*, 1998) and forms autogamous ascocarps (Bertault *et al.*, 2001). Genome sequencing (Martin *et al.*, 2010) revealed a bipolar incompatibility (with two MT alleles, MT1 and MT2; Rubini *et al.*, 2011ab). Furthermore, microsatellite (SSR) loci support genetic diversity, but also allogamy: while the ascocarps flesh (the gleba; Fig. 1) is made of a single haplont, specific DNA extraction procedures for ascospores (Rubini *et al.*, 2011b) revealed that a second haplont exclusively contributes to the diploid zygote from which ascospores are issuing by meiosis (Fig. 1). The gleba haplonts can be found on surrounding ECM roots (Rubini *et al.*, 2011a; Murat *et al.*, 2013) and likely feed the ascocarp (Le Tacon *et al.*, 2013). The later haplont is considered maternal, while the haplont contributing by its genes only is considered paternal (Fig. 1). Interestingly, the paternal genotype can be deduced from the zygotic one by difference with gleba genotype. The default expectation (Korf, 1973) is that each *T. melanosporum* haplont is potentially hermaphroditic, i.e. can contribute paternally or maternally, although direct field evidence is hitherto lacking. Parental haplonts were hitherto never found on nearby ECM roots (Rubini *et al.*, 2011a), and the level of inbreeding remains to assess (Selosse *et al.*, 2013). While spermatia are described for some *Tuber* species (Urban *et al.*, 2004), they are not described in *T. melanosporum*, and the possibility of a gametic gene flow remains pending in *T. melanosporum*.

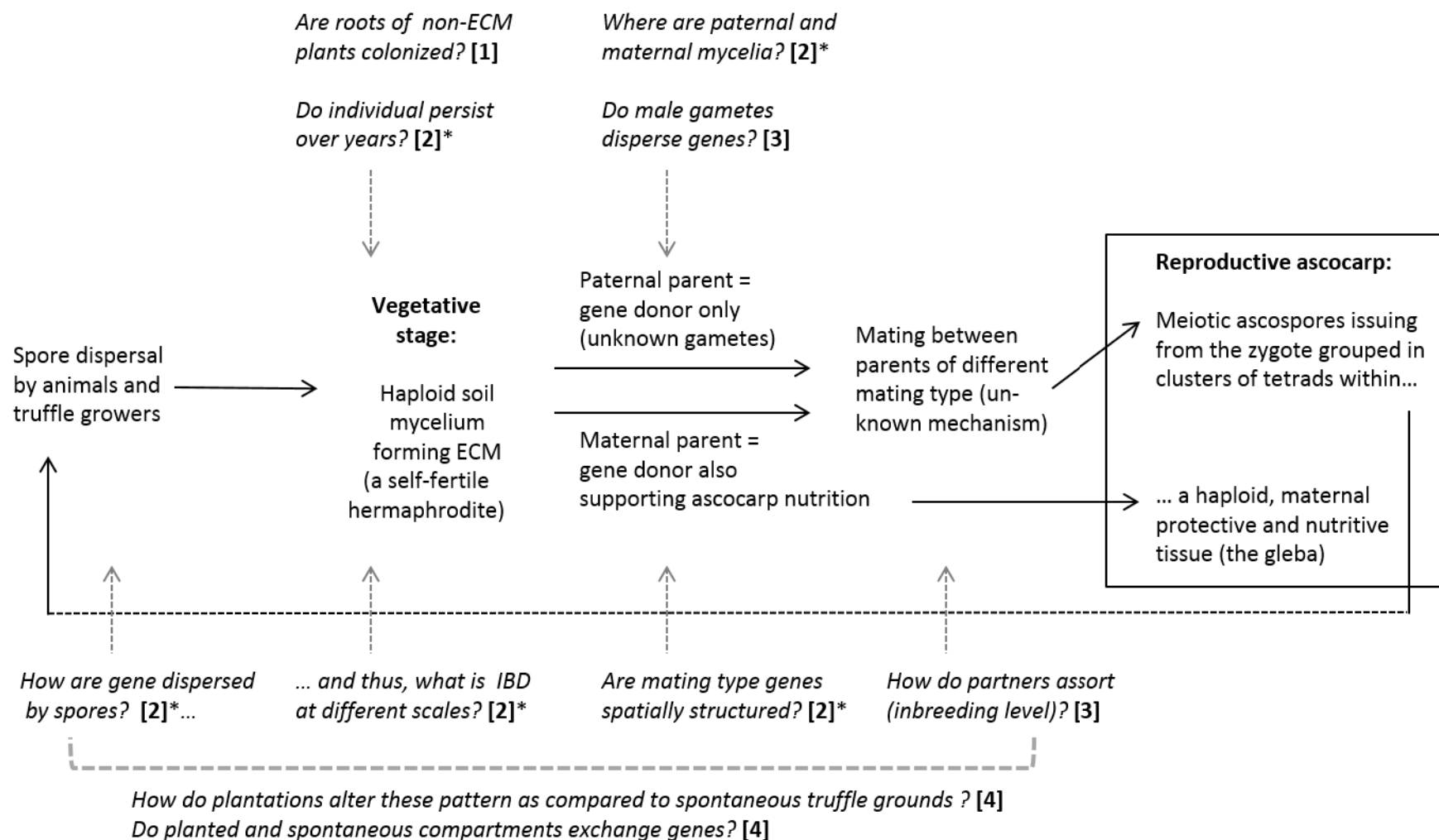
The vegetative stage also raises open questions. *T. melanosporum* haplonts occur in poorly-growing vegetation patches around host trees, the brûlés (Streiblová *et al.*, 2012), where several small, metric maternal haplonts produce up to a dozen of ascocarps per year, and sometime vanish in the next years (Murat *et al.*, 2013). Populations display a strong genetic isolation by distance (IBD) at level of brûlé (<5 m; Murat *et al.*, 2013) or truffle-ground (< 100 m; Bertault *et al.*, 2001). Unexpectedly, spatially close genets seem to carry identical MT (Rubini *et al.*, 2011a; Murat *et al.*, 2013), likely due to progressive elimination of the other MT (Rubini *et al.*, 2011a). However, no statistical support was provided hitherto and the impact of MT aggregation on inbreeding and gametic limitation remains debated (Linde & Selmes, 2012; Selosse *et al.*, 2013; Rubini *et al.*, 2014). Finally, although direct evidence is lacking, *T. melanosporum* may also colonize the roots of non-ECM herbaceous plants, as

suggested by microscopic observations (Plattner & Hall, 1995) and molecular evidence in other *Tuber* species (Gryndler *et al.*, 2014). The genotypes and MTs of non-ECM individuals were not investigated so far, and their contribution to the population genetic structure and to paternal genotypes remains unknown (Selosse *et al.*, 2013).

An additional factor potentially shaping populations is the on-going *T. melanosporum* domestication, since 80% of ascocarps are now produced in planted truffle-grounds (Hall *et al.*, 2003). Reproduction is not fully controlled, and mycelium survival and ascocarp formation are indirectly favoured by empiric managements, so that we face an interesting proto-domestication step (Zeder, 2008). In plantations, trees are massively inoculated by adding fruitbodies to nursery soil before outplanting and ascocarp fragments are periodically dispersed on soil in an empirical attempt to 're-inoculate' trees (Callot, 1999; Murat, 2014). Such treatments may modify dispersal, normally vectored by ascocarps-eating animals (Génard *et al.*, 1988; Piattoni *et al.*, 2014; Hochberg *et al.*, 2003; Fig. 1), and possibly the dispersal of male gametes. Even if inoculations can enhance genetic diversity at local scale, the whole diversity and outbreeding level in plantations may be reduced due to a bottleneck for populations from plantations (as reported for crop species Glémin & Bataillon, 2009; Miller & Gross, 2011), while diversity may be more spatially homogeneous at regional scale (reduced IBD) due to commercial exchange of inoculated plants.

Here, we investigate pending issues on *T. melanosporum* population biology mentioned above (Fig. 1), within four major investigations: [1] mycelial presence on non-ECM roots; [2] genetic diversity and gene dispersal, based on analysis of IBD with special focuses on MT aggregation, vegetative distribution and persistence of paternal and maternal genets; [3] partners' assortment and inbreeding level in zygotes, to assess a possible contribution of male gametes to gene dispersal; Finally [4], we compare spontaneous and planted (proto-domesticated) compartments for their respective diversity, potential isolation from each other, and differences for the two later issues [2,3]. For this, we use a large sampling of ascocarps, ECMs and non-ECM roots, over several years, at various scales (including brûlé, truffle-ground, and regional scale; Table 1), and covering plantations (where trees are inoculated) and spontaneous truffle-grounds (uninoculated) from Southern France.

Figure 1. *Tuber melanosporum* lifecycle, and the various questions addressed in this study (*italics*). Each haploid, vegetative mycelium is a self-sterile hermaphrodite capable of producing both male and female gametes. The various pending issues are related to the four main questions [1] to [4] addressed in the paper (see Introduction and Table 1), and an asterisk indicates the questions already addressed in previous studies, although from plantations or spontaneous truffle grounds exclusively. IBD, isolation by distance.



Materials and methods

Study sites and ascocarps sampling

Ascomycetes from spontaneous truffle-grounds and plantations were sampled at three scales: brûlé, truffle-ground and regional scale (Table 1) in South-East France. Most sampled truffles grounds are irrigated, with pruned trees, superficial soil plowing, and managed herbaceous plants, but inoculation differs: it is natural in spontaneous truffle-grounds that are self-established, while plantations (1) are established by trees inoculated by spores from one to several ascomycete(s), often from various nurseries, and (2) receive, at least for sites sampled at brûlé scale, recurrent dispersal of ascomycetes fragments on soil in late winter.

At brûlé scale, ascomycetes were exhaustively mapped (Fig. 2 and S1) in 2010 to 2014 from two spontaneous brûlés at Pezilla-de-Conflet (SB1 under *Quercus pubescens*; 42°44'21"N, 2°28'57"E) and Tourbes (SB2 under on *Quercus ilex*; 43°26'48"N, 3°22'46"E) and from two planted brûlés PB1 and PB2 each under *Q. pubescens*, 1.5 km away from each other at Nant (44°01'18"N, 3°18'02"E). Four more brûlés were selected but did not produce enough for our study. We thus also re-used freeze-dried ascomycetes from a planted brûlé at Viols-le-Fort (PB3; 43°44'39"N, 3°42'20"E) collected in 1995 to 1997 by Bertault *et al.* (2001).

At truffle-ground scale, ascomycetes were mapped (Table 1 and Fig. S2) in 2013 to 2014 on two natural truffle-grounds at Montaren-St-Médiers (SG1; 44°01'50"N, 4°22'49"E) and Le Beaucet (SG2; 43°59'05"N, 5°07'13"E). We genotyped ascomycetes from a plantation at Viols-le-Fort (PG1; 43°44'39"N, 3°42'20"E) freeze-dried by Bertault *et al.* (2001) in 1995 to 1997. Finally, for some investigations, we re-analyzed the data obtained by Murat *et al.* (2013) on a plantation at Rollainville (SG2; 48°21'37"N, 5°44'52"E).

At regional scale, we sampled additional ascomycetes from diverse spontaneous truffle-grounds and plantations (Table 1) across Languedoc-Roussillon and bordering regions (Provence-Cote-d'Azur and Midi-Pyrénées; 0.5 cm³ per ascomycete). All samples were stored at -20 °C until molecular analyses.

ECM and non-ECM root sampling

ECM root tips were sampled on SB1 (Fig. 2a) and PB1 (Fig. S1a) in February 2011 under positions of ascomycetes found in 2010-2011, using a 10 cm large, 20 cm-long soil corer. A fine-scale ECM sampling was also performed on two square zones of SB1 (0.5 and 1 m²; Fig. 2a), where soil was sampled every 15 cm with the same corer. Within two days, ECM root tips with *T. melanosporum* ECM morphology (Miguel & Saez, 2005) were recovered and stored at -20 °C (Table 1). We also investigated *T. melanosporum* presence and diversity on roots of non-ECM plants growing on brûlés, based on two samplings. First, we sampled 113 plant individuals from 45 non-ECM species in spring 2010 in order to test for the presence of *T. melanosporum* on roots (Table 1; see sites and species in Table S4a): we sampled a variable number of 2-mm-root fragments (n = 3 to 8 replicates per individual), depending on the size of the root systems. Second, non-ECM roots of seven plants were sampled in spring 2013 on SB2, close to ascomycetes from the previous winter (see names and position on Fig. 2b; Table S4b): we sampled two to five 2-mm-root fragments per individual according to root system size. All non-ECM roots were carefully washed within one day after harvesting, to eliminate soil particles, and surface-sterilized using a solution of sodium hypochloride (2% v/v) and Tween 80 (5% w/v) for 10 s and three rinses in sterile water (Roy *et al.*, 2009). All samples were stored at -20 °C.

Molecular analyses

DNA from ECM, non-ECM roots and ascomycetes (to obtain maternal DNA) were extracted using the RED Extract-N-Amp Kit following manufacturer's instructions. We extracted DNA from ascospores to access the zygotic genotypes (and deducing paternal genotypes) based on the protocol by Paolocci *et al.* (2006). Thin gleba slices from frozen ascomycetes were cut with a sterile razor blade and collected in 5 ml

sterile distilled water in a Petri dish. Asci and ascospores sedimenting in water were recovered with a micropipette in 2 ml tubes with 80 μ l distilled water, and crashed with steel spheres in a BeadBeater (MM301, Retsch, Haan, Germany) for 60 s (30 jolts s⁻¹). Disruption was ensured under microscope, and DNA from 5 μ l of crushed-spore suspension was extracted as above. The presence of *T. melanosporum* on ECM and non-ECM roots was tested using the specific primers MelF and MelR as in Douet *et al.* (2004). On all extracts (ascocarps, ECMs and a sub-sample of non-ECM roots, 961 samples in all; Table 1), MT typing was performed by PCR amplification using primers p19-p20 and p1-p2 as in Rubini *et al.* (2011b), in a final reaction volume of 10 μ l. For genotyping, fourteen primer sets were selected from Murat *et al.* (2011) on the criterion of high expected heterozygosity (Table S1), and PCR reactions were carried out in a total volume of 10 μ l (containing 5 μ l of Multiplex Quiagen, 1 μ l of the multiplexed primers mix (2 μ M), 1 μ l of Q Quiagen Buffer, 2 μ l of sterile water and 1 μ l of DNA extraction). PCR were conducted in a Mastercycler gradients thermocycler (Eppendorf, Le Pecq, France), with initial denaturation of 15 min at 95°C, 40 cycles of denaturation, annealing and elongation respectively at 94°C for 30 s, 55°C for 90 s and 72°C for 90 s, followed by a final extension at 72°C for 10 min. The resulting SSR DNA fragments were separated in an ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer using 500 LIZ (Life Technology, Carlsbad, USA) as size marker. The SSR locus me09, difficult to interpret, was discarded from analysis.

SSR genotype delineation

The Rollainville dataset was based on 9 loci analyzed in Murat *et al.* (2013). For the sampling of this study, SSR profiles were analyzed with GeneMapper[®] Software (Applied Biosystems, Foster City, CA USA). For gleba, ECM or non-ECM roots, we first discarded all samples for which more than two loci did not successfully amplify. Second, some glebas spontaneously displaying heterozygosities, likely due to contamination by spore DNA, were discarded. Zygotic genotypes (investigated in sampling at brûlé scale, Table 1) were only considered if amplification of the two MT alleles was successful, as criterion confirming efficient spore DNA extraction (even of numerous samples provided heterozygosity at up to two SSR loci without confirming MT heterozygosities). Then, paternal genotypes were then obtained by difference with gleba (maternal) genotype. For inbreeding analyses in brûlé populations (Table 1), all SSR loci were considered for zygotes. For other analyses, we defined haploid multilocus genotypes (MLGs) based on the mating-type and SSR loci. To avoid genotyping uncertainties, we further screened SSR data and, considering separately the brûlés and truffle-ground scales, we first discarded (1) SSR loci with more than 9 % of missing data in the focus scale, resulting in elimination of Tm2 and Tm98 at brûlé scale, and Tm2 and Tm21 at truffle-ground scale, and subsequently, (2) samples with missing data for one or more SSR loci in the remaining dataset. We obtained one 'MLG dataset' per population, and the probability of each MLG (P_{Gen}) was estimated based on SSR allelic frequencies in the population of the focus brûlé or truffle-ground. For MLG represented more than once in ascocarps, ECM and/or non-ECM roots, the probability of issuing from independent events of sexual reproduction (P_{sex} ; Parks & Werth, 1993; Arnaud-Haond & Belkhir, 2007) was calculated by MLGsim (Stenberg *et al.*, 2003; http://www.rug.nl/fmns-research/theobio/downloads/manual_MLGsim2.0.pdf).

Assortment of sexual partners

Heterozygote deficit were estimated from the zygotes of the five investigated brûlés (Table 1). Since parental haploid genomes are known, the heterozygote deficit test based on Levene's (1949) distribution conditional on observed allelic counts is not appropriate. We compared the observed heterozygote deficit to its distribution under random pairing of available parental and maternal MLG (10000 permutations) for each brûlé, using R (R Core Team, 2014). The score statistic (Rousset, 2008; see eq.9), or equivalently Robertson and Hill's (1984) estimator of F_{is} was calculated on zygotes for each brûlés using Genepop 4.4 (Rousset, 2008). To compare heterozygote deficit between spontaneous and planted brûlés, the observed heterozygote deficit of each zygote was normalized (referred to as

normalized 1-Qintra) by the genetic diversity of its original brûlé (1-Qinter) calculated on zygotes, where Qinter is the observed frequency of identical pairs of genes among samples as defined and calculated with Genepop 4.4 and compared between the two compartments (spontaneous *versus* planted) by a Wilcoxon-test.

Interannual persistence of MLGs

Persistence was estimated from the MLG datasets at brûlé and truffle-ground scales (Table 1). Correlation between the number of produced ascocarps, or MLG size (approximated as the maximal distance between its ascocarps), and the number of season of fructification of each MLG was calculated by a Spearman's rank correlation test on compiled data from the brûlés and truffle-ground scale.

Diversity and spatial structure at truffle-ground scale

Diversity indices were calculated based on the MLG dataset, using GenClone v.2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007). Clonal diversity was estimated as $R = (G-1)/(N-1)$ according to (Dorken & Eckert, 2001), where N is the sample size and G the number of MLGs. The Simpson's complement index (1-D) was calculated to assess clonal heterogeneity as the probability that two randomly sampled ascocarps in the population have distinct MLGs. Clonal evenness (ED) was estimated as in Fager (1972). Since spatial analyses can be biased by clonality (i.e. repeated sampling of the same MLG), we created a culled MLG dataset with only one sample per MLG and truffle-ground, with a virtual spatial MLG position at the iso-barycenter of all corresponding ascocarps positions. We then tested for a spatial aggregation of the MT alleles by Mantel tests on each truffle-ground (Table 1) with 9999 permutations (Genepop v.4.4): significance of the overall hypothesis of aggregation was evaluated by Fisher's combined probability test, combining probabilities from independent tests on each truffle-ground, and comparing the distribution to a Chi-squared distribution with 2k degrees of freedom (Fisher, 1925). Patterns of IBD were studied on SSR data using the statistic $\hat{a}$, a generalization of $F_{st}/(1 - F_{st})$ between pairs of individuals (Rousset, 2000) that is approximately linearly related to the logarithm of distance, $\hat{a} \approx (\ln(d)/4\pi D\sigma^2) + C$, where d is the geographical distance between two individuals, D is the density of effective individuals, σ^2 is the second moment of the dispersal distance (i.e. the mean squared parent-offspring distance), and the C is the value of the linear approximation at d=1 length unit (Sumner *et al.*, 2001). We regressed $\hat{a}$ against the logarithmic distance ($\ln(d)$) between individuals with the estimation of a confidence interval at 95% of coverage probability. The correlation between genetic and geographic distances was tested by a Mantel tests (9999 permutations) based on the rank correlation newly implemented in Genepop v.4.4 (Rousset, 2008). The inverse of the regression slope b provides an estimate of the 'neighbourhood size' $1/b = 4\pi D\sigma^2$ (as established for two-dimensional habitats; Rousset 2000). Additional verification was performed by a maximum likelihood approach using Migrate (Leblois *et al.*, 2013).

Diversity and spatial structure at regional scale

Analyses at regional scale are based on a dataset cumulating: (1) ascocarps from the specific regional sampling (whenever one ascocarp was heterozygous at one SSR locus, haploidization was performed by randomly retaining one allele using the newly implemented option 8.6 in Genepop v.4.4; Rousset, 2008), and (2) one randomly chosen representative ascocarp per maternal MLG from each populations sampled at brûlé or truffle-ground scales (Table 1). We considered all 13 SSR loci to maximize the statistical power, and distinguished samples from planted and spontaneous compartments. Diversity in each compartment was estimated by computing the total number of alleles and gene diversities under Genepop 4.4 as (1-Qinter), as defined above. IBD was analyzed by a regression of $\hat{a}$ against $\ln(d)$ as above, in each compartment as well as between pairs of ascocarps from different compartments to evaluate their differentiation.

Table 1. Sampling design at three scales, with number of collected samples and the five questions addressed.

Scale	Site	Type ¹	Samples				Analyses				
			Sampling	Ascocarps ²	ECM	Non-ECM roots	[1] Presence on non-ECM roots	[2]a Genetic diversity and IBD	[2]b MLG persistence and MT aggregation	[3] Zygotic and paternal MLG, inbreeding	[4] Comparison planted / spontaneous
Brûlé	SB1	S	2010-14	37	91	178					
	SB2	S	2010-14	22	-	196+33 ³					
	PB1	P	2010-14	32	30	-	✓		✓	✓	✓
	PB2	P	2010-14	39	-	-					
	PB3	P	1995-97 ⁴	19	-	-					
Truffle ground	SG1	S	2013-14	263	-	-					
	SG2	S	2013-14	89	-	-	✓	✓	✓		✓
	PG1	P	2013-14	147	-	-					
	PG2	P	2010-12 ⁵	59	-	99					
Regional	SR	S	2012	52	-	-					
	PR	P	2012	67	-	-		✓			✓

¹ S, spontaneous truffle-ground type; P, plantation.

² Number of ascocarps, ECM and non-ECM roots were sampled in 2011 and 2013 respectively.

³ All 229 non-ECM roots were used for testing *T. melanosporum* presence, while 33 only were used for genotyping (Table S4).

⁴ Samples from Bertault *et al.* (2001), reanalyzed for this study based on a new genotyping.

⁵ Data published by Murat *et al.* (2013), reanalyzed in this study for spatial analyses only.

Results

Genetic diversity and inbreeding at brûlé scale

We first investigated the diversity maternal genotypes in ascocarps collected from five brûlés that produced 19 to 39 ascocarps each (Table 2; see Figs. 2 and S1 for spatial distribution). Spontaneous brûlés were slightly larger than the planted ones and, although their genotyping success was lower, spontaneous brûlés tended to display more maternal MLGs than the planted ones (7 to 12 *versus* 2 to 8; Table 2). When considering by the brûlé surface, however, MLG density was always close to the mean value for all brûlés (0.15 MLG m^{-2}). Maternal MLG size, as estimated by distances between most distant ascocarps, did not vary among the five brûlés (Table S2). Spontaneous brûlés had higher clonal diversity and lower maximal number of ascocarp than the planted ones, with the dominant maternal MLG accounting for 65 to 93 % of the total ascocarp production on planted brûlés, *versus* 18 and 34 % only on spontaneous brûlés (Table 2). Inter-individual diversity (1-Qinter) did not vary much (Table 2).

We then investigated the diversity of zygotic genotypes and inferred that of paternal genotypes. Amplification of the two MT alleles and zygotic genotyping was successful for 70 (47.2 %) of ascocarps (Table 2). Paternal MLGs were more numerous on planted brûlés (Table 2), so that the ratio of paternal to maternal MLGs was 1 and 1.4 on spontaneous brûlés *versus* 3.5 to 6.5 on planted brûlés. Paternal MLGs presented new SSR alleles as compared to maternal ones, up to 14 new alleles per planted brûlé, *versus* 1 or 2 per spontaneous brûlé. No clear trend appeared for inter-individual diversity (1-Qinter) among paternal MLGs between planted *versus* spontaneous brûlés, except that, compared to the value for maternal MLGs, diversity was similar on spontaneous brûlés but 2-10 times higher on planted brûlés (Table 2). Paternal clonal diversity was similar over all kinds of brûlés and 3 times higher on average (0.78 ± 0.22) than the maternal one (0.26 ± 0.23 ; Table 2). In all, only 7 paternal MLGs were found more than once, but we cannot exclude that they result from independent sexual recombinations since they had non-significant P_{sex} (Table S2; except MLG14 on PB2). Only one was found as maternal MLG in another ascocarp found 2.5 m away (MLG11 on SB1; Fig. 2a), but again P_{sex} was non-significant. Considering zygotic diploid genotypes, 0 to 40% of ascocarps per brûlé were homozygous for SSR markers (i.e. parents differed by MT only; Table 2), and compared to the maternal MLGs, paternal MLGs provided few additional alleles per zygote (0.97 ± 1.03 on spontaneous *versus* 2.20 ± 1.90 on planted brûlés; difference non-significant). Thus, all brûlés showed significant heterozygote deficit, especially the spontaneous ones (Table 2), and the observed heterozygosity (as seen by normalized 1-Qintra) was significantly lower in spontaneous than planted brûlés (Wilcoxon-test, $W=159$, $P = 1.38e^{-10}$).

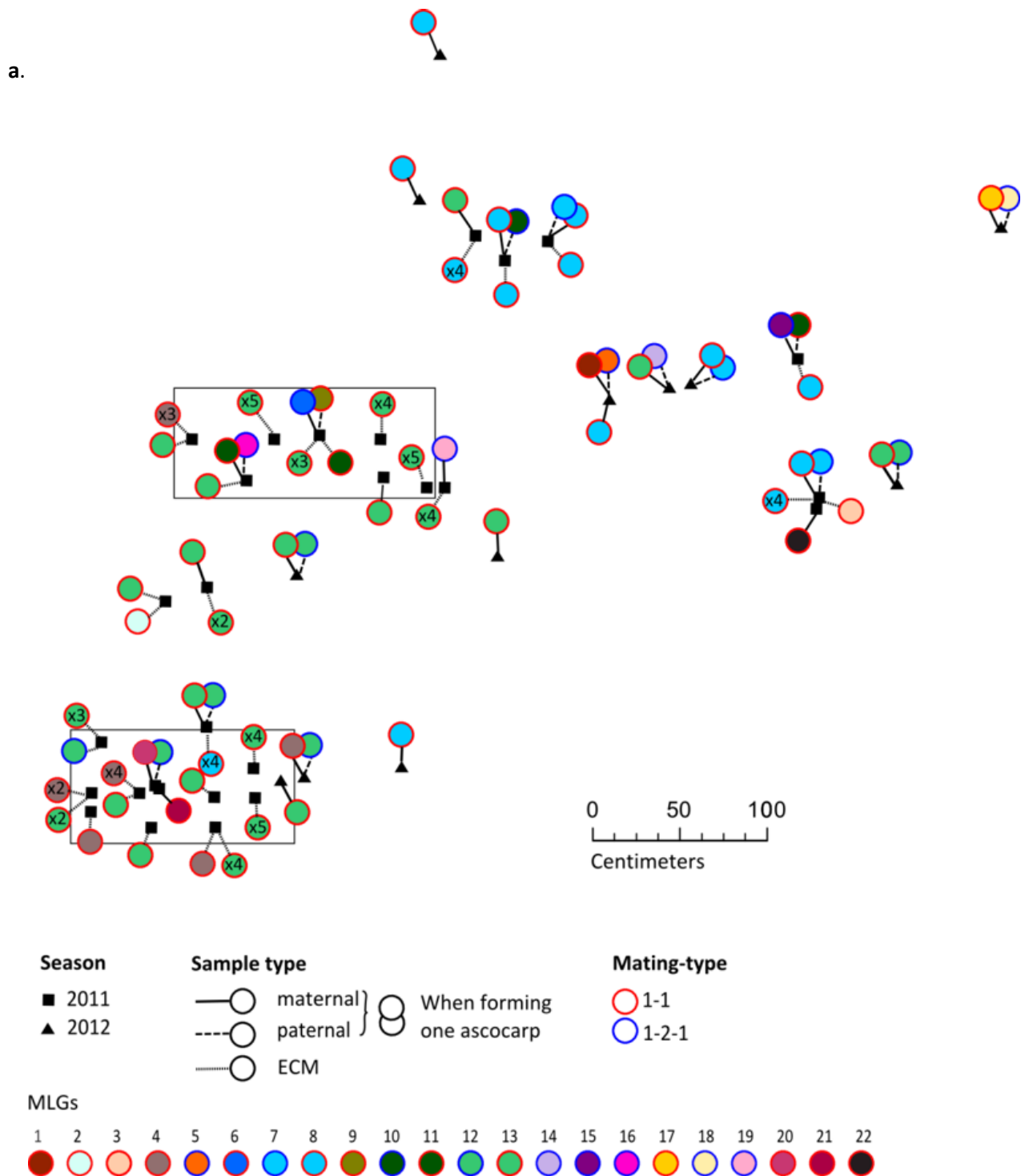
Genetic diversity and parental tracking on ECM roots

We assessed the genetic relatedness between vegetative ECM mycelia and closely growing ascocarps by sampling ECMs from brûlés SB1 and PB1 in February 2011 at positions where ascocarps were found in the 2010-2011 fruiting season (Table 1). ECMs were found on 86 and 63 % of soil cores from SB1 and PB1 respectively, revealing up to two MLGs per position (Figs. 2a and S2a). In all, 6 and 2 MLGs were recovered from 44 and 14 *T. melanosporum* ECMs on SB1 and PB1 respectively (Table 2), with MT corresponding to that of surrounding maternal MLGs (with MT1 and MT2 respectively). Maternal MLGs of previously found ascocarps were recovered on ECMs from 4 (out of 11) positions on SB1 and from 6 (out of 6) positions on PB1. More generally, most ECM MLGs (74% on SB1 and 93 % on PB1) belonged to the two maternal MLGs that dominated among ascocarps of the brûlé. Paternal MLGs were never found on ECMs from same position, except on SB1 where two paternal MLGs were found on ECMs from a different position (MLG11, MLG12; Tables 2 and S2) but these MLG had non-significant P_{sex} .

Finally, a systematic fine-scale ECM sampling was performed in summer 2011 on two zones of SB1, over 0.5 and 1 m² areas where ascocarps production was high in previous winter (see localization on Fig. S2a). These zones respectively revealed one and three MLGs from 15 and 21 ECMs, all displaying

MT1. Two of these MLGs were also maternal, but none were paternal on the respective brûlés (Fig. S2a).

Figure 2. MLGs identified from ascocarps, ECM and non-ECM roots on two spontaneous brûlés. (a), brûlé SB1, with delineation of the two zones of fine-scale ECM samplings. (b), brûlé SB2, with position of the non-ECM plants sampled: a and b, *Geranium robertianum*; c, *Sedum sediforme*; d, *Catapodium rigidum*; e, *Reseda phyteuma*; f, *Erophila verna*. Spatial positions of harvested samples are indicated by a square in 2011, a triangle in 2012 and a circle in 2013. The color of the disk encodes the MLG, and that of the circle encodes the MT (red, MT1; blue MT2). This disk is linked to the sample position by a line encoding the sample type: continuous for maternal MLG, dashed line for paternal MLG (maternal and paternal MLGs from the same ascocarp are superposed), and dotted for non-ECM plant roots.



b.

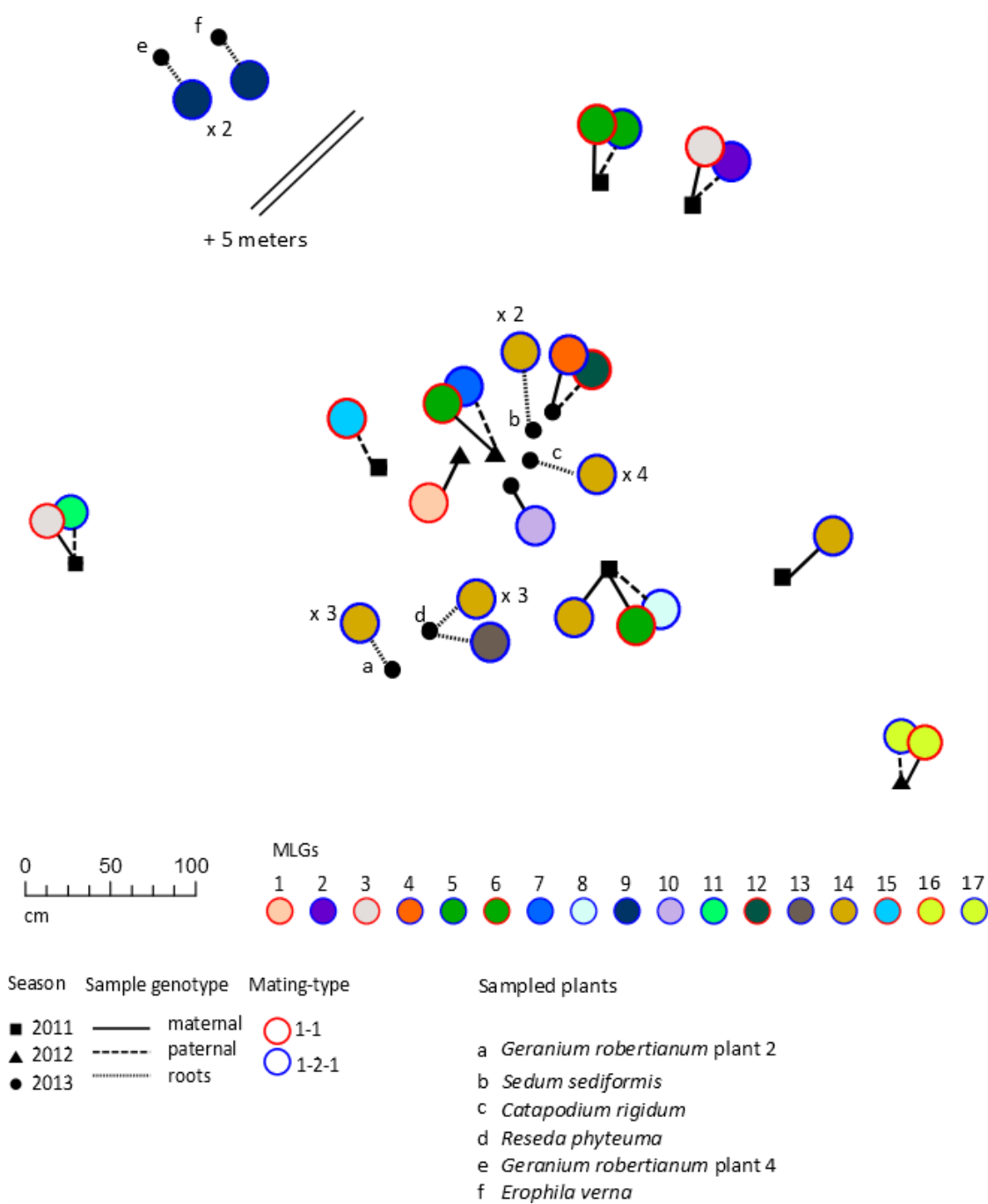


Table 2. Genetic diversity on the two spontaneous brûlés (SB1 and SB2) and three planted brûlés (PB1, PB2 and PB3).

Sites	SB1	SB2	PB1	PB2	PB3
Nb. sampling seasons (see Table 1)	3	4	4	4	3
Mean diameter of the brûlé (m)	5.5	5.5	3.5	3.5	2.0
Nb. sampled ascocarps (nb. maternally genotyped ¹)	37 (29)	22 (11)	32 (28)	39 (35)	19 (15)
Nb. of maternal MLGs (nb. MT1+MT2)	12 (10+2)	7 (4+3)	2 (0+2)	8 (1+7)	2 (2+0)
Max. ascocarp number par maternal MLG	10	2	22	23	14
Maternal clonal diversity	0.39	0.60	0.04	0.21	0.07
Inter-individual diversity (1-Qinter) for maternal MLGs	0.14	0.39	0.13	0.19	0.04
Nb. persistent maternal MLGs (over max. 2; 3; 4 years)	2; 1; -	1; 0; 0	1; 1; 0	0; 1; 0	1; -
Nb. genotyped zygotes ²	15	7	19	23	6
Nb. paternal MLGs (and corresponding maternal MLGs)	9 (9)	7 (5)	13 (2)	15 (4)	6 (2)
Nb. of paternal specific alleles	2	1	5	14	8
Paternal clonal diversity	0.5	1	0.78	0.63	1
Inter-individual diversity (1-Qinter) for paternal MLGs	0.15	0.39	0.25	0.35	0.40
Nb. persistent paternal MLGs (found over 2; 3; 4 years)	2; 0;-	0; 0; 0	2; 0; 0	2; 0; 0	0;-
Nb. homozygous zygotes (% of genotyped ones) ³	6 (40%)	1 (12.5%)	5 (26.3%)	5 (21.7%)	1 (16.7%)
Fis (and p-value) ⁴	0.63 (0*)	0.82 (0*)	0.51 (0*)	0.44 (0*)	-0.20 (-)
Intra-individual diversity (normalized 1-Qintra) for zygotes	0.073	0.081	0.11	0.16	0.36
Nb. of genotyped ECM ¹ (total nb. <i>T. melanosporum</i> ECM)	44 (57)		14 (14)		
Nb. of non-ECM roots genotyped ¹ (and nb. of plants)	-	17 (7)	-	-	-
Nb. of vegetative MLGs found	6	3	2	-	-
Nb. also occurring as maternal/paternal MLGs	4/2	1/0	1/0	-	-

¹ Successful SSR genotyping for inclusion in the MLG dataset, see criterions in Materials and Methods.² Successful amplification of the two MT alleles and sufficient SSR genotyping for inclusion in the MLG dataset.³ Parents with same SSR genotype, but different MT.

(Table 2) ⁴ Test comparing the observed heterozygote deficit to that expected under random pairing of available parental and maternal MLG of the brûlé (see Material and Methods; *, $P < 0.001$; this test could not be performed on SB2 that displays a single maternal MLG).

In all, maternal MLGs can be found on ECM surroundings ascocarps, but this was not demonstrable for paternal MLGs.

Presence of *T. melanosporum* on non-ECM roots

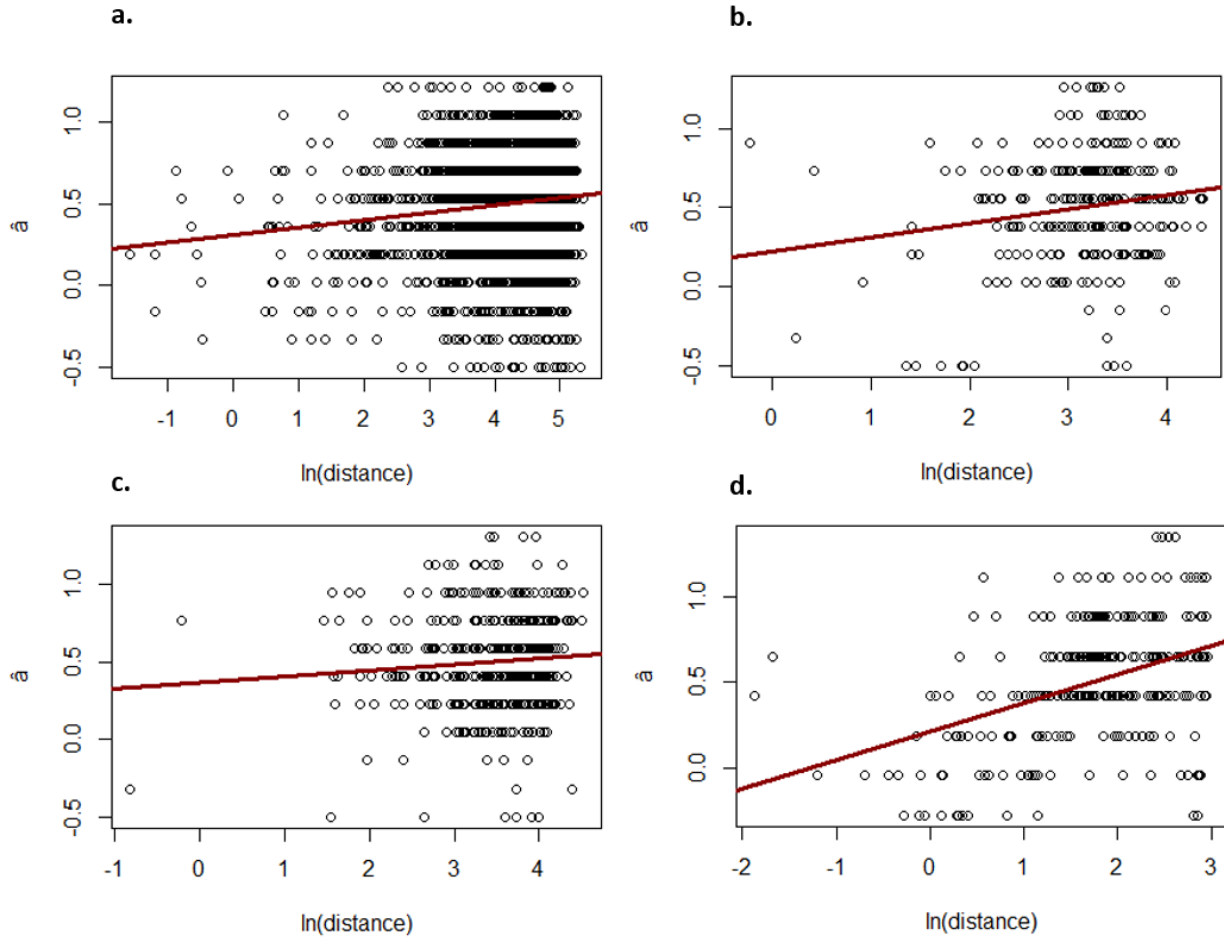
We tested the presence of *T. melanosporum* on roots of non-ECM plants growing on brûlés (Table 1). A first preliminary test using *T. melanosporum*-specific ITS primers on 473 surface-sterilized roots from 45 non-ECM plant species (see list in Table S4a) detected this fungus in 44.4% of the tested roots (Table S4a), i.e. in at least one root of all the 45 species. Furthermore, direct sequencing of the fungal ITS amplified with primers ITS1F and ITS4 was tentatively performed on 79 randomly chosen replicates, and provided good quality *T. melanosporum* sequences for 21 roots (26.6%; GenBank XXXXXX) and ECM fungal sequences for 10 roots (including *Inocybe*, Thelephoraceae, Sebacinaceae and Pezizomycetes species; GenBank XXXXXX; Table S4c). Thus, *T. melanosporum* (and to a lesser extent other ECM fungi) was molecularly detectable in roots of non-ECM plant growing on brûlé.

Second, we focused on *T. melanosporum* genetic diversity in non-ECM roots, using 33 root fragments from five species sampled at SB2 (Tables 2 and S4b; see Fig. 2b. for spatial distribution). *T. melanosporum*-specific ITS primers detected the fungus on 27 root fragments, and MLGs were successfully delineated from 17 of these (Table 2). They belonged to three haploid MLGs sharing the MT2 present on the closest maternal MLGs (Fig. 2). Each root system displayed a single MLG, except a *Reseda phyteuma* where two MLGs differed at one locus (Table S4b). One MLG found 12 times on non-ECM roots corresponded to the maternal MLG from two nearby ascocarps (MLG14, which had a significant P_{sex} ; Fig. 2b; Table S4b), but none corresponded to any paternal MLG.

Strong IBD on truffle-grounds

We compared IBD on spontaneous and planted truffle-grounds, investigating additionally two spontaneous truffle-grounds and one plantation (Tables 3 and S2; see Fig. S2 for spatial distributions) and mining into data from a plantation analyzed by Murat *et al.* (2013; currently PG2). Among newly investigated sites, spontaneous truffle-grounds displayed higher mean brûlé size, mean maternal MLG number and mean clonal diversity (Table 3), congruently with previous observations at brûlé level; the mean density of maternal MLG ranged from 0.02 to 0.44 MLG m⁻² (assuming a discoid shape). All truffle-grounds displayed similar diversity index and evenness (Table 3), as well as significant and strong IBD for maternal MLGs. IBD regression coefficient ranged from 0.04 to 0.17 (Fig. 3; Table 3). This translated into neighborhood size (the inverse of the IBD slope) between 6 on SG2 and 26.3 on SG1, so that spatially close genets are also genetically very close. A ML approach using Migrate provided identical neighborhood size values, with even narrower confidence intervals (not shown). When considering each brûlé as a population and estimating IBD among brûlés on each truffle-ground, no significant spatial pattern was found (Fig. S3). As soil tilling was carried out passing through tree lines generally toward the same direction, we also tested at whether a directional IBD signal was perceptible among (*versus* along) tree lines in the plantations, but no significant signal was detected (not shown). Thus, strong IBD was mainly found at brûlé level, but not detected between brûlés.

Figure 3. Isolation by distance analyses regressing genetic distance ($\hat{a}$) to the logarithm of spatial distance (meters) on culled MLG data of spontaneous truffle grounds SG1 (a) and SG2 (b) and of planted truffle grounds PG1 (c) and PG2 (d).



Aggregation of mating types

Although both MTs have identical spatial distributions at the zygotic stage, all maternal MLGs had the same MT in two out of the five brûlés (Table 2), and as stated above, our fine-scale ECM and non-ECM root samplings revealed a single MT in all vegetative MLGs from an investigated microsite. This suggested some aggregation of MTs alleles. When combining data from the samplings at brûlé and truffle-ground scales, we investigated 41 brûlés from spontaneous truffle-grounds and 31 from planted ones, from which 23 and 8 respectively showed more than one maternal MLG (difference non-significant; $\chi^2=2.06$; $df=1$; $P=0.15$). A subset of 11 and 5 brûlés, respectively, displayed a single MT ($\chi^2=0.004$; $df=1$; $P=0.96$), so that we did not detect different MT aggregation between spontaneous and planted truffle-grounds. Aggregation was further tested by Mantel tests on the four investigated truffle-grounds on culled MLG data set (Table 3), and the tests for each truffle-ground were then combined by Fisher's method (see Materials and Method) that supported aggregation of MT alleles ($df=8$, $P=0.0003$).

Table 3. Genetic diversity on the two spontaneous truffle-grounds (SG1 and SG2) and two plantations (PG1 and PG2¹).

Analysis	Truffle-ground	SG1	SG2	PG1	PG2 ¹
Description	Nb. brûlés (and total nb. ascocarps)	25 (263)	14 (89)	30 (147)	4 (59)
	Mean (and max) brûlé size (m) ²	7.15 ± 8.7 (34.6)	3.9 ± 1.7 (6.4)	0.86 ± 0.54 (2.11)	3.7 ± 3.8 (9.5) ¹
Genotyping	Nb. MLG (nb. genotyped ascocarps ³)	65 (151)	18 (63)	29 (83)	-
	Mean nb. of maternal MLG per brûlé	3 ± 2.3	1.5 ± 0.6	1.03 ± 0.2	-
	Mean clonal diversity per brûlé ⁴	0.55 ± 0.30	0.24 ± 0.30	0.07 ± 0.25	-
	Maximum ascocarp nb. per MLG	29	24	16	-
	Nb. MLG (%) lasting more than 1 season	10 (15.4%)	6 (33.3%)	11 (37.5%)	3 (12%) ⁵
Diversity	Simpson's diversity index (1-D)	0.94	0.83	0.93	-
	Evenness (ED)	0.84	0.75	0.89	-
Structure	IBD over whole truffle-ground ⁵	0.05 [0.005-0.1] s	0.09 [0.04-0.15] s	0.04 [0.005-0.08] s	0.17 [0.08-0.28] s
	MT aggregation (and p-value) ⁶	0.12 (p<0.001)	-0.07 (p=0.76)	0.03 (p=0.62)	0.34 (p<0.001)

¹ data from Murat *et al.* (2013) that differ by slightly different SSR loci and a sampling of the four most productive brûlés of the plantation, were used for persistence and IBD analysis only.

² Maximal distance between two ascocarps from same MLG and brûlé.

³ Successful SSR genotyping for inclusion in the MLG dataset, see criteria in Materials and Methods.

⁴ Calculated on brûlés with more than one ascocarp.

⁵ Regression slope with significance issuing from comparison of regression slope obtained with 95% confidence intervals (s, significant).

⁶ Mantel-test (with p-values) for the MT, performed on culled MLG data set (see Materials and Methods).

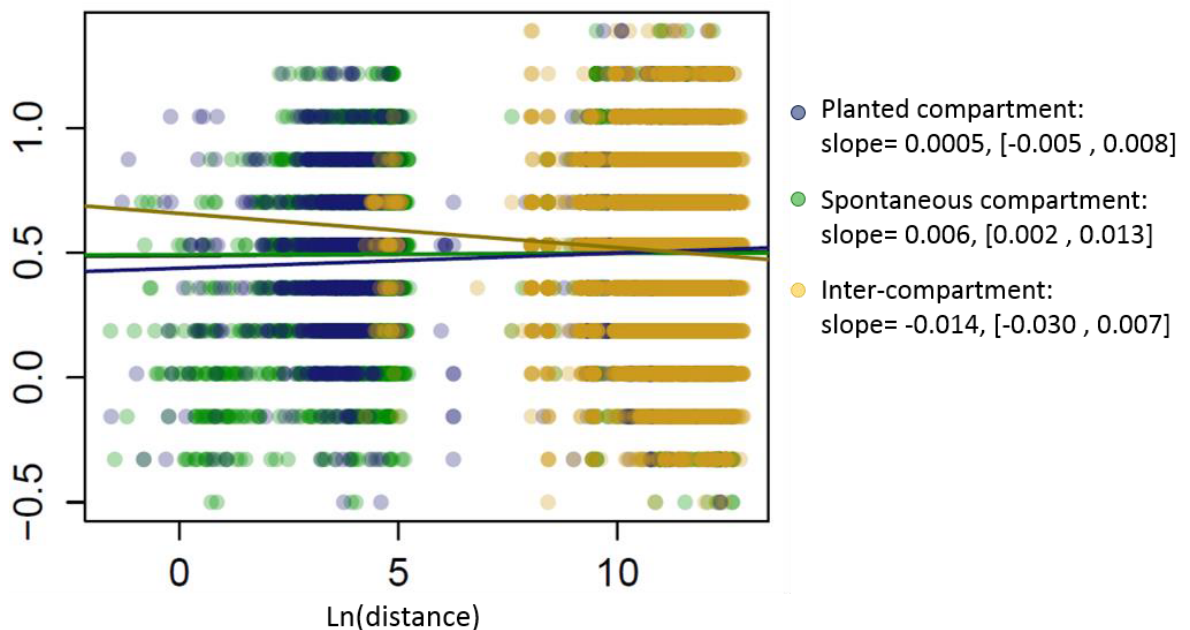
Inter-annual MLG persistence

We investigated MLG persistence within our datasets. First, at the brûlé scale, maternal MLG persistence tended to be variable among brûlés and never reached 4 years (Table 2), while paternal MLG persistence was even more rare (3 MLGs out of 22) and never observed over 3 years (Tables 2 and S2). Second, considering maternal MLGs from truffle-ground scale, persistence ranged from 21 to 37% (Tables 3 and S3). In addition, while most persisting maternal MLGs had significant P_{sex} , this applied to only one paternal MLG from PB2 (Tables S2 and S3). We failed to reveal clear difference between planted and spontaneous truffle-grounds. Finally, combining data from both samplings, MLGs that persisted over at least two years produced significantly more ascocarps per season and had larger maximal distance between ascocarps (Spearman's rank correlation test, $\rho = 0.62$ and 0.72 respectively; $P < 0.001$), even when limiting the analysis to MLGs with significant P_{sex} . Thus, observed persistence was biased toward the largest MLGs.

Spontaneous vs. planted diversity at regional scale

We compared the genetic diversity in spontaneous and planted compartments based on maternal MLGs from 675 ascocarps encompassing these from the regional scale sampling (Table 1) and one representative ascocarp per maternal MLG from the samplings at brûlé and truffle-ground scales (Table 3), i.e. 325 ascocarps from planted truffle-grounds and 350 from spontaneous truffle-grounds. Among 13 SSR loci, 8 had higher allele number in planted *versus* spontaneous compartment (not significant according to a Wilcoxon test; $v=56.5$; $P=0.46$), and 40 *versus* 34 private alleles respectively. Overall genetic diversity among individuals (1-Qinter) was 0.535 *versus* 0.503, so that the level of genetic diversity did not greatly differ among these compartments, and there was no evidence for isolation between compartments ($F_{st}=0.03$). Because it is not obvious whether compartment-related variation in genetic differentiation can be interpreted independently of distance, isolation by distance was considered. Only the planted compartment showed a weak IBD (slope: 0.006, confidence interval [0.002,0.013], blue dots on Fig. 4). Since the confidence interval for the spontaneous compartment (slope: 0.0005, [-0.008,0.015]; green dots on Fig. 4) included that of the planted one, no difference in IBD was supported between the two compartments. Furthermore, no compartment-related genetic differentiation was detected at any distance between these compartments (yellow dots on Fig. 4).

Figure 4. Isolation by distance analyses regressing genetic distance ($\hat{a}$) to the logarithm of spatial distance (meters) at the regional scale. IBD was assessed separately within ascocarps from the spontaneous and planted compartments (respectively, the green and blue dots), between ascocarps of the two compartments (yellow dots) and over all ascocarps (black linear regression).



Discussion

The analysis of 1453 samples (826 ascocarps, 121 ECM and 506 non-ECM roots) sampled at various scales provided insights into pending questions of *T. melanosporum* biology (Table 1 and Figure 1). First, we found preliminary evidence that *T. melanosporum* also colonises non-ECM roots. Second, brûlés display strong IBD, and maternal MLGs (1) display MT aggregation, (2) colonize surrounding roots, and (3) can last over years, but the two later trends were not detected for paternal MLGs. Third, zygotes were highly inbred, supporting a limited spatial dispersal of paternal gametes. Fourth, differences in genetic diversity (for paternal MLGs and partners' assortment) were found between spontaneous truffle-grounds and plantations at local scales (especially a higher paternal diversity that reduces zygotic inbreeding), but spontaneous and planted compartments did not differ in diversity and were not isolated from each other at larger scales. We successively discuss these results below, in relationship with *T. melanosporum* biological traits and cultivation methods.

T. melanosporum interacts with non-ECM plants

On brûlés, *T. melanosporum* was detected at high frequency on roots of all 45 non-ECM plant species tested. Its presence on non-ECM plant roots was suspected since Plattner & Hall (1995) showed colonization of brûlé weeds and grasses by immunological methods, and since *T. melanosporum* was serendipitously found on orchids roots (Girlanda *et al.*, 2006). Yet, in contrast with the observations by Plattner & Hall (1995), the current roots looked healthy, suggesting a biotrophic interaction. Gryndler *et al.* (2014) detected by qPCR frequent and heavy presence of the related *T. aestivum* on healthy-looking roots from various plant species on the brûlés of this truffle, and suggested a colonization of dead decomposing cells from the root surface. In our investigations, *T. melanosporum* did not only colonize the rhizosphere and root surface, since roots were surface-sterilized before detection, so that we hypothesize endophytism in non-ECM roots. The finding of a few haploid MLGs, some identical with the surrounding maternal MLGs, further supports that (1) haplonts of size larger than the investigated root pieces are involved, and (2) our detection was not due to superficial spores resisting disinfection. Moreover, although this sampling only allows very preliminary conclusions at population level, these haplonts display the MT aggregation as for maternal MLGs (see below).

Such endophytism in non-ECM roots could be widespread in Pezizomycotina, if not in ECM fungi. Indeed, other fungal sequences recovered by direct ITS sequencing during our survey were all from ECM fungi (see Table S4c). ECM fungi can be sporadically found along with regular mycorrhizal fungi in roots of some non-ECM plants (e.g. Bougoure *et al.*, 2007; Těšitelová *et al.*, 2015), although systematic detection was not undertaken in plants that form arbuscular mycorrhizae or are not mycorrhizal. Moreover, endophytic abilities are reported in some ECM taxa, such as *Tricholoma* spp. (Murata *et al.*, 2012, 2013), *Hygrocybe* spp. (Seitzman *et al.*, 2010), or Sebaciniales (Selosse *et al.*, 2009). It is even hypothesized that ECM fungi may have evolved from root endophytic ancestors that progressively gained closer interaction with roots (Selosse *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2015), so that endophytic abilities may have persisted as an ancestral trait in some ECM fungi.

In the specific case of *T. melanosporum* and other *Tuber*, the exact morphological and physiological interaction remains unclear, but calls the perplexing question of the cause for brûlés. Although the roots looked healthy (exactly as these colonized by *T. aestivum* in Gryndler *et al.*, 2014), a slightly deleterious interaction may contribute to reduce plant growth on the brûlé as postulated by Plattner & Hall (1995), and explain why truffle volatiles stop growth and induce oxidative burst in *Arabidopsis thaliana* (Splivallo *et al.*, 2007). Indeed, the genome of *T. melanosporum* reveals enzymatic ability to attack plant cell walls (Martin *et al.*, 2010), more than other ECM species (van der Heijden *et al.*, 2015).

Thus, endophytic ability of *T. melanosporum* (and possibly other ECM fungi) deserves specific functional research in the future, especially in the framework of br  l   formation.

High IBD at br  l   scale *versus* spore dispersal at larger scales.

The strong IBD for maternal MLGs at br  l   level, which is weak or undetectable at higher scales (truffle-ground or region), is congruent with earlier reports on *T. melanosporum*: Bertault *et al.* (2001) found IBD around focus trees, but not between different trees, and Murat *et al.* (2013) reported high IBD up to 5 m, with neighborhood size similar to our values. MLGs found in our fine-scale ECM and non-ECM root samplings were indeed very often similar (e.g. the two MLGs from a *Reseda phyteuma* differed by a single allele). While IBD is often absent among ECM species forming wind-dispersed spores (Douhan *et al.*, 2011), it can be higher for species with hypogeous, animal-dispersed spores such as the basidiomycete *Rhizopogon* spp. (Kretzer *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2013). Three non-exclusive properties may contribute to IBD in *T. melanosporum*: animal dispersal, spore persistence in soil, and possibly local kin selection.

Ascospores dispersal by faeces may entail a massive co-deposition of genetically related spores from the same ascocarp(s) eaten by the disperser, so that inoculum is much less mixed than for wind-dispersed species. Such a kin aggregation is reported for seed dispersal by frugivores (e.g. Choo *et al.*, 2012), and its extent largely depends on the feeding behaviour and digestive physiology that account for the number of ascocarps present in one faecal deposit. At higher scales, animal dispersal favours large gene flow, which may explain why less IBD is detectable at truffle-ground or region scales. Animals allow efficient dispersal (Frank *et al.*, 2009), and larger herbivore that ingest truffle, such as deer and wild boar, can cover distances longer than 2,000 metres over 48 hours (Janeau & Spitz, 1984 ; Pellerin *et al.*, 2015) while wild boars occupy 40 to 150 km² areas (Janeau & Spitz, 1984). This explains why hypogeous fungi successfully colonize pioneer trees, at least as efficiently as wind-dispersed fungi (Ashkannejhad & Horton, 2006). Few specific data are available for *Tuber* spp., and we now need to know more on the behaviour and digestive physiology of truffle dispersers to clarify whether ascocarp admixture and dispersal in faeces reasonably account for the observed IBD.

Second, the important spore bank issuing from undetected ascocarps, made of highly related spores due to inbreeding (see below), may outcompete spores arriving after population foundation (Kretzer *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2013). Many ascocarps remain undetected (Richard, Sauve, Taschen & Selosse, pers. obs.), and although not quantified so far, a spore bank is congruent with two observations on *T. melanosporum*. First, Belfiori *et al.* (2012) recovered ITS haplotypes from soil that were absent from underlying ECMs; second, (Rubini *et al.*, 2011a) detected *T. melanosporum* by PCR in soils devoid of ECMs, and found the two MT alleles in soils where a single MT formed ECM. Undispersed spores of hypogeous animal-dispersed fungi usually dominate soil spore banks (e.g. *Tuber* and *Rhizopogon* spp.; Glassman *et al.*, 2015; Taylor & Bruns, 1999), protected by their thick walls adapted to resist animal digestive enzymes (Piattoni *et al.*, 2014). Even if direct evidence is lacking for *T. melanosporum*, *Rhizopogon* spp. survive over years (Miller *et al.*, 1994) with some dormancy (i.e., a germination potential increasing with years; Bruns *et al.*, 2009). Yet, *Rhizopogon* spp. IBD is less pronounced (or even absent) at metric scale as compared to *T. melanosporum*: we suggest that *Tuber* spp. lifecycle further reinforces IBD. In *Rhizopogon* as in other basidiomycotas, mating occurs just after spore germination, before establishment of a post-zygotic vegetative mycelium, controlled by a multiallelic MT locus: newly incoming meiotic spores often display compatible MTs and are advantaged as compared to local spores sharing MT with the spore bank. Conversely, in the haploid *T. melanosporum*, any ascospore can establish after germination without mating, levelling the advantage of exogenous spores, and reinforcing IBD.

Finally, it is unclear how MT aggregation contributes to the observed IBD. We confirmed that spatially close genets often carry an identical MT, as reported by Rubini *et al.*, (2011a) and Murat *et al.* (2013).

We provide the first quantitative support, based on culled MLG data that avoid biases due to large and productive maternal MLGs. Although samples were less numerous, ECM and non-ECM roots also display MT aggregation at metric scale. MT aggregation looks paradoxical since spore bank and animal dispersal mix both MTs. Experimental inoculations support a progressive local elimination of one MT after establishment of spores carrying the two MTs (Rubini *et al.*, 2011a), but the reason for this remains unclear (Le Tacon *et al.*, 2015). One hypothesis proposes a gene controlling vegetative incompatibility (VI), placed within the non-recombining zone surrounding the MT locus (Murat *et al.*, 2013; Selosse *et al.*, 2013). In fungi, VI avoids hyphal fusion between non-kin individuals carrying different alleles for controlling gene(s), while stable fusion and cooperation occurs between kin with identical alleles (Glass *et al.*, 2000). This protects from exploitation by non-kin, and reinforces kin. Evidence for VI is currently pending for *T. melanosporum* (Iotti *et al.*, 2012), but exists in the related *T. borchii* (Sbrana *et al.*, 2007), and in some ascomycotas, VI locus are linked to the MT locus (Shiu & Glass, 2000; Glass *et al.*, 2000). In VI, controlling gene(s) should be sufficiently polymorphic to reliably indicate kinship when identical (Debets & Griffiths, 1998), so that the bi-allelic MTs are unlikely to be directly involved. Under this hypothesis, MT aggregation would be a by-product of aggregation of alleles from a polymorphic VI locus genetically linked to MT. Such a scenario remains to be tested on genomic regions surrounding MTs, but it would reinforce IBD by screening for relatedness among co-existing MLG, and against genetically unrelated new incomers.

We thus cannot exclude that, beyond inoculum dispersal, spore bank and perhaps mechanisms driving MT aggregation reinforce IBD: this would explain why nursery inoculation (Murat, 2014) does not challenge this IBD pattern in plantation (see below), in spite of likely different inoculations.

Inbreeding and restricted gametic gene flow

Zygote genotypes showed that *T. melanosporum*, although not a selfing species (as found by Riccioni *et al.*, 2008), has high inbreeding level, especially in spontaneous truffle-grounds. Failed amplification of some alleles is unlikely to bias the results, because (1) we limited the data set to zygotes successfully amplified for both MT alleles, so that paternal alleles were accessible, and (2) genotyping proved reproducible when replicating the SSR amplification. Short alleles can display artefactual dominance due to preferential amplification, leading to false homozygotes (Kretzer *et al.*, 2004), but no SSR locus showed preferential amplification of short alleles (Fig. S4). Indeed, Riccioni *et al.* (2008) also reported such low heterozygosity, with one or two heterozygous SSR loci (out of 5 investigated) for only 7 out of 58 *T. melanosporum* ascocarps, reaching a *Fis* of 0.41 close to our data (see Table 2). Inbreeding also exists in *Tuber magnatum*, although supported by a limited number of ascocarps (Paolocci *et al.*, 2006), and may be common among truffle species. Assuming that IBD applies to MLGs from both MT, an easy explanation for inbreeding is that paternal MLGs are found in close vicinity to maternal MLGs. Indeed, considering haploid MLGs detected in the fine-scale ECM root samplings on SB1, and ignoring their MT, the virtual zygotic genotypes obtained by pairing MLGs from a same core provide a similarly high homozygosity on average (*Fis*=0.6). Thus, the pattern of spore deposition and accumulation in the spore bank, associated to local partner recruitment, could explain the inbreeding in *T. melanosporum*, and the absence of gene flow by way of male gametes. Another fungal species that disperse large clusters of meiotic spores, *Cyathus stercoreus*, also displays high inbreeding due to sibling co-dispersal (Malloure & James, 2013). However, although this diploid basidiomycota suffers from the resulting inbreeding depression (Malloure & James, 2013), fitness decrease due to inbreeding is unlikely in *T. melanosporum* since zygotes do not undergo vegetative growth, and haploidy efficiently purges deleterious alleles.

Paternal MLGs in close vicinity to maternal ones look however incompatible with the MT aggregation described above that locally excludes the second MT. On the one hand, we indeed never reliably detected paternal MLGs around the corresponding truffles; on the other hand, maps of ascocarps in

our work and other (Rubini *et al.*, 2011a; Murat *et al.*, 2013) clearly show that they are not restricted to the boundaries between areas of different MTs (Le Tacon *et al.*, 2015), so that paternal MLGs mate even within an area where MLGs of opposite MT dominate vegetatively. The production of possible spermatia by many Pezizomycota (Healy *et al.*, 2013) and some truffles (Urban *et al.*, 2004) prompted the hypothesis that paternal gametes may have a distant origin. Such spermatia allow male gametic gene flow, by way of wind or insect dispersal, as described in other Ascomycota (e.g. Guidot *et al.*, 2003; Bultman *et al.*, 1998), and may circumvent MT aggregation in *T. melanosporum*, but this would not account for the observed inbreeding. Moreover, spermatia were not recorded so far for *T. melanosporum* (despite repeated attempts; Urban & Selosse, pers. data), and this would not explain the high inbreeding observed. It would be interesting to compare the inbreeding level in *Tuber* species where spermatia are described (Urban *et al.*, 2004), but for *T. melanosporum* at least, paternal MLGs have to be searched close to maternal ones.

Two non-exclusive reasons can render paternal MLGs poorly detectable. First, their low size and/or temporal fugacity may disfavour detection on ECM or non-ECM roots. Accordingly, both clonal diversity and observed size of paternal MLGs support a smaller size than maternal MLGs. On the maternal side, apparent persistence, size and frequency of detection in ascocarps correlated (as in Murat *et al.*, 2013), so paternal MGL persistence may be more difficult to assess. In species where paternal MLGs are as large as maternal ones, each paternal MLG contributes to multiple fertilizations, as described in some ascomycotas (Guidot *et al.*, 2003) and tree species (Lian *et al.*, 2001): here, paternal MLG contributed to less zygotes than maternal MLG (see clonal diversity in Table 2), supporting again a smaller size. Second, a different ecology for paternal mycelia may limit the relevance of our sampling for their detection: they may be limited to non-ECM roots (although we did not detect them and found MT aggregation, our sampling was not large enough to exclude this), or they may even saprotrophically survive in soil. Although isotopic abundances (Zeller *et al.*, 2008) and labelling experiments (Le Tacon *et al.*, 2013) support trees as main carbon source of ascocarps, the rich enzymatic set in *T. melanosporum* as compared to other ECM fungi (Martin *et al.*, 2010) may allow saprotrophic survival of small germlings, even if further growth is limited by their MT. Small-sized soil mycelia may explain that polymorphism detected in soil encompass alleles absent from the vegetative ECM population, including for MT (Belfiori *et al.*, 2012; Rubini *et al.*, 2011a), and even without specific protocol for spore DNA extraction. An extreme scenario is that germinating ascospores act as gametes, an intriguing possibility (see Guidot *et al.*, 2003) still waiting for direct evidence. In *T. melanosporum*, 50% of the soil spore bank is indeed sexually compatible with the locally dominant MT. In all, we hypothesize dwarf paternal mycelia (Selosse *et al.*, 2013), avoiding the MT exclusion by way of a different size and/or ecology. In other words, the high spore bank of hypogeous ascocarps could have allowed a regression in some truffles of spermatia (the probable ancestral male function in Pezizomycotas; Healy *et al.*, 2013) and of the associated paternal spatial gene flow.

Whatever the nature of paternal mycelia, it profoundly differ from the maternal one in size and detectability, and does not allow gametic gene flow. In addition, we did not detect clear evidence for actual hermaphroditic behaviour, since the rare MLGs found as paternal and maternal partners had non-significant P_{sex} . It is tentative to speculate that the potential hermaphroditism in *T. melanosporum* undergoes developmental reorientation, with local MT-associated asymmetry, with well-established mycelia of the locally dominant MT investing resources into maternal support to zygotes, while mycelia of the other MT only investing the less costly male contribution (perhaps the only one they can afford indeed). Future studies may more carefully detect paternal mycelia at centimetric scale, and the observation of the elusive fertilization structures would clarify the male contribution (Le Tacon *et al.*, 2015).

Spontaneous and planted populations differ mainly at local scale

Finally, considering the current proto-domestication for *T. melanosporum*, our comparative design tests how plantation practices affect the above-discussed trends. Although our analysis is limited in geographical range and population replicates, two trends were revealed: increased diversity was found at brûlé level for paternal MLGs diversity only, but no difference occurred at other scales, which invalidated our predictions of lower diversity and higher spatial homogeneity in the proto-domesticated compartment.

Spontaneous brûlé tended to be larger, as expected because regularly spaced trees in plantation have independent brûlés, whereas brûlés from randomly distributed trees can coalesce in spontaneous truffle-grounds. Thus, the finding of more maternal MLGs on spontaneous brûlés was buffered when normalizing by brûlé area. Moreover, genetic diversity did not differ, and the only maternal difference was more productive MLGs in planted brûlés (i.e. lower clonal diversities). Strikingly, paternal MLGs show again different trends compared to maternal ones. They were more numerous on planted brûlés than on spontaneous ones (especially when normalizing by brûlé area); they displayed more genetic diversity as compared to maternal ones in plantations, which was not observed on spontaneous brûlés, and this resulted in a lower heterozygote deficiency in plantations. These trends have to be analysed in the light of inoculation in plantations that involves (1) initial tree inoculation by a mix of ascospores and (2) recurrent dispersal of ascocarp fragments on soil (at least for plantations sampled at brûlé scale), as opposed to a continuous but likely sparser zoochoric spore flow in spontaneous sites (Murat, 2014). First, the limited impact on maternal MLGs suggests similar genetic diversities in natural and anthropic initial inoculant. Alternatively, under the hypothesis of kin selection by VI, the genetic diversity may always be levelled by the success of a few related genets that, by way of the spore bank, reinforces their dominance over time. Second, the more productive maternal MLGs in spontaneous brûlés are more enigmatic: they could relate to a better access to tree roots of some MLGs through higher competitiveness. In the future, more detailed mappings of MLGs on ECMs at fine scale in inoculated *versus* spontaneous brûlés may test this hypothesis. Third, the diversity of paternal MLGs may be explained if they take better profit from the recurrent dispersal of ascocarps: their higher turnover and possibly independent niche (that may avoid VI; see above) may allow the paternal population to incorporate more diverse incomers. This especially applies under the hypothesis where germplings are recruited for fertilization (see above). Yet, we do not know the genetic signature of ascocarps used for recurrent dispersal of ascocarps, so that their contribution deserves more controlled analyses. In the future, a genetically characterized ascospore input could be traced within the diversity of paternal MLGs.

At truffle-ground and regional scales, planted and spontaneous truffle-grounds revealed no IBD: other studies reached similar conclusion at truffle-ground (Bertault *et al.*, 2001; Murat *et al.*, 2013) and regional (Riccioni *et al.*, 2008) scales, which does not preclude IBD above regional scale (Murat *et al.*, 2004). This limits our ability to detect any homogenisation by commercial exchange of *T. melanosporum* diversity in plantations. Indeed, no evidence for isolation between the two compartments was found, and the slightly higher diversity and weak IBD in the planted compartment were not statistically supported. The bottleneck often entailed by domestication (Glémin & Bataillon, 2009; Gross & Olsen, 2010; Qi *et al.*, 2013) does not apply, probably because plantations and spontaneous are sympatric, and both growers' inoculation and wild animals mix both sources, homogenising the compartments. Congruently, although domestication often entails lower heterozygosity (Glémin & Bataillon, 2009; Parker *et al.*, 2014), diversity of paternal MLGs allowed zygotic heterozygosity in *T. melanosporum* plantation. There is evidence from crop species that some managements limit genetic reduction (Casas *et al.*, 2007; Parker *et al.*, 2014); moreover, *T. melanosporum* has not undergone any selection so far (Selosse *et al.*, 2013), which also contribute to reduce genetic diversity. Moreover, evidence for maternal MLGs survival (see also Murat *et al.*, 2013)

suggests that the domestication of perennial, rather than annual crop species, is relevant for comparison with *T. melanosporum*. Perennial species tend to naturally show less population structure than annual ones (Duminil & Michele, 2009; Miller & Gross, 2011), and during domestication, undergo more limited bottleneck and inbreeding increase than annual crops (Miller & Gross, 2011), especially in the area of origin where they maintain genetic exchanges with their wild relatives (Delplancke *et al.*, 2012).

We finally note that management of soil and/or herbs and shrubs in spontaneous truffle-grounds may have affected most 'spontaneous' populations investigated here (unfortunately, undisturbed truffle-grounds are unlikely to exist anymore). As soil tilling is carried out passing through tree lines toward the same direction, it was tested whether a more pronounced signal was perceptible between *versus* along tree lines, but no significant signal was detected in any truffle-ground (not shown). Moreover, management generally shows various degrees of introduction of inoculated trees and recurrent dispersal of ascocarp fragments, even in spontaneous truffle-grounds, so that a continuum exists between spontaneous and planted truffle-grounds. Although this study focused on truffle-grounds differing by inoculation methods according to the owners, it is sometimes difficult to reconstruct the exact truffle-ground history, and this may limit our ability to recover clear genetic patterns.

The absence of isolation between compartments and increase in paternal diversity, due to incomplete domestication and possibly to management habits, are original traits to be confirmed in further studies from other regions. *Tuber melanosporum* is thus an interesting model of early fungal domestication. One interesting perspective is a comparative analysis of truffle-grounds from the Southern Hemisphere (Hall *et al.*, 2003; Linde & Selmes, 2012), where *T. melanosporum* has been recently introduced far from wild any populations.

Conclusions

Population genetics of *T. melanosporum* cumulates specific traits of Ascomycota lifecycle (Figure 1) and animal (or anthropic) dispersal of hypogeous ascospores. Our study confirms previously reported (1) strong IBD at brûlé scale, that may result from spore deposition by animal and spore bank; (2) MT aggregation, that may result from a hypothetical VI and thus could contribute to IBD; and (3) interannual persistence and presence on nearby ECM roots of maternal MLGs. More analyses on the genetic diversity of spores in animal faeces are now required to test whether it can account alone for the observed IBD. Zygote analysis revealed high inbreeding that suggests immediate vicinity of paternal MLGs and excludes long-distance gametic gene flow (thus making spermatia contribution unlikely). This questions the exact place of paternal mycelia, normally excluded by MT aggregation from mother's vicinity. Although we show evidence that non-ECM plants from the brûlé are colonized by *T. melanosporum*, they revealed only maternal MLGs and the locally dominant MT. Thus, paternal mycelia behave differently as compared to maternal ones, and are too small and/or too different ecologically to be detected in our study; moreover, their interannual persistence remains questionable. This suggests that, although hermaphroditic, *T. melanosporum* mycelia from each MT locally specialize into an asymmetric development and contribution to fertilization. We speculate that the spore bank may act as paternal source, and that the abundant undispersed spores may have allowed, together with a haploid lifecycle that limits inbreeding depression, the recruitment of germlings as male gametes. This may have, in turn, reinforced IBD (and perhaps favoured selection of the hypothetical VI). In the future, more detailed analyses of MLGs in non-ECM root and soil is thus required. A comparative analysis with related, non-hypogeous ascomycotas (eg. from the ECM sister clade Helvellaceae) would determine what is driven by spore dispersal, specific to *Tuber* spp., and by a predominantly haploid lifecycle, shared by relatives. Moreover, we now need more data on the physiology and morphology of *T. melanosporum* interaction with non-ECM plants. Finally, the limited impact of plantation practices, except on male diversity, calls for more replicate studies, especially out of the area of origin, and for a

more careful investigation of the impact of the different truffle grower's treatments, especially of recurrent dispersal of ascocarp fragments in truffle-grounds.

Acknowledgments – We deeply acknowledge the truffle-grounds owners, Pierre Bernadach (SB1), Christophe Bot (SB2), Jean-Paul Laurents (PB1-2), Gilbert Serane (PB3, PG2), Paul Stengel (SG1), Jean-François Tourrette (SG2), and Annie Guillen, Hervé Coves, Alain Champagnac, Sylvain Foissac and Frederique Serre for access to field site and help in sampling, as well as the 63 truffle growers who contributed to the regional sampling. This work was funded by the French *Agence Nationale de la Recherche* (programme SYSTERRA) and the *Région Languedoc-Roussillon* (program SYSTERRA-LR), with the supports of the *Centre d'Etudes Techniques et de Formation Forestières Languedoc-Roussillon*, and the *Fédération Française des Trufficulteurs*. We also thank Bernard Assénat, Fabien Halkett, Daniel Mousain and Adrien Taudière for their help in sampling and processing the samples, Michel Raymond, Diana Fernandez and Gabriel Callot for access to their samples (SB3), as well as Claude Murat for access to PG2 data. Molecular genetic analyses were performed thanks to the technical facilities of the Laboratoire d'Excellence "*Centre Méditerranéen de l'Environnement et de la Biodiversité*"; M.-A. Selosse is supported by the Laboratoire d'Excellence BCDiv. This work is part of E. Taschen's PhD thesis work funded by the Fondation de France.

Supplemental data

Table S1 – SSRs loci characteristics and selection for data analyses.

Table S2 – MLGs details (persistence, size) with probabilities (P_{sex} and P_{Gen}) at brûlé scale.

Table S3 – MLGs details (persistence, size) with probabilities (P_{sex} and P_{Gen}) at truffle-ground scale.

Table S4 – MLG data / roots & plants.

Fig. S1 – Maps of ascocarps and ECM MLGs on planted brûlés (PB1, PB2, PB3).

Fig. S2 – Maps of ascocarp MLGs (including fruiting seasons), MT and MT on culled MLG data on each studied truffle-ground (SG1; SG2; PG1; PG2).

Fig. S3 – Isolation by distance analyses regressing genetic distance $F_{ST}/(1-F_{ST})$ (with common denominator) to the logarithm of spatial distance (meters) when each brûlé was considered as a population in spontaneous truffle-grounds SG1 (a) and SG2 (b) and of planted truffle-grounds PG1 (c) and PG2 (d).

Fig. S4 – Alleles frequencies of the 13 SSRs, calculated on all cumulated data.

References

Arnaud-Haond S, Belkhir K. 2007. genclone: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* **7**: 15–17.

Ashkannejhad S, Horton TR. 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist* **169**: 345–354.

Belfiori B, Riccioni C, Tempesta S, Pasqualetti M, Paolocci F, Rubini A. 2012. Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology* **81**: 547–561.

Bertault G, Raymond M, Berthomieu A, Callot G, Fernandez D. 1998. Trifling variation in truffles. *Nature* **394**: 734–734.

- Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M. 2001.** Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* **86**: 451–458.
- Billiard S, López-Villavicencio M, Hood ME, Giraud T. 2012.** Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 1020–1038.
- Bougoure DS, Parkin PI, Cairney JWG, Alexander IJ, Anderson IC. 2007.** Diversity of fungi in hair roots of Ericaceae varies along a vegetation gradient. *Molecular Ecology* **16**: 4624–4636.
- Bruns TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP. 2009.** Inoculum potential of Rhizopogon spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytologist* **181**: 463–470.
- Bultman TL, White JF Jr, Bowdish TI, Welch AM. 1998.** A new kind of mutualism between fungi and insects. *Mycological Research* **102**: 235–238.
- Callot G. 1999.** *La truffe, la terre, la vie*. Paris: Editions INRA.
- Casas A, Otero-Arnaiz A, Pérez-Negrón E, Valiente-Banuet A. 2007.** In situ Management and Domestication of Plants in Mesoamerica. *Annals of Botany* **100**: 1101–1115.
- Choo J, Juenger TE, Simpson BB. 2012.** Consequences of frugivore-mediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a neotropical palm. *Molecular Ecology* **21**: 1019–1031.
- Debets AJM, Griffiths AJF. 1998.** Polymorphism of het-genes prevents resource plundering in *Neurospora crassa*. *Mycological Research* **102**: 1343–1349.
- Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P. 2010.** Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. : 501–535.
- Delplancke M, Alvarez N, Espíndola A, Joly H, Benoit L, Brouck E, Arrigo N. 2012.** Gene flow among wild and domesticated almond species: insights from chloroplast and nuclear markers. *Evolutionary Applications* **5**: 317–329.
- Dorken ME, Eckert CG. 2001.** Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* **89**: 339–350.
- Douhan GW, Huryn KL, Douhan LI. 2007.** Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. *Mycologia* **99**: 812–819.
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse M-A. 2011.** Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biology* **115**: 569–597.
- Duminil J, Michele MD. 2009.** Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **143**: 528–542.
- Dunham SM, Mujic AB, Spatafora JW, Kretzer AM. 2013.** Within-population genetic structure differs between two sympatric sister-species of ectomycorrhizal fungi, *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus*. *Mycologia* **105**: 814–826.

- Fager EW. 1972.** Diversity: A Sampling Study. *The American Naturalist* **106**: 293–310.
- Fisher RA. 1925.** *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Frank JL, Anglin S, Carrington EM, Taylor DS, Viratos B, Southworth D. 2009.** Rodent dispersal of fungal spores promotes seedling establishment away from mycorrhizal networks on *Quercus garryana*. *Botany* **87**: 821–829.
- Génard M, Lescourret F, Durrieu G. 1988.** Mycophagie chez le sanglier et hypothèses sur son rôle dans la dissémination des spores de champignons hypogés. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2324–2327.
- Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, Ghignone S, Pinelli P, Segreto R, Loreto F, et al. 2006.** Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15**: 491–504.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. 2000.** The Genetics of Hyphal Fusion and Vegetative Incompatibility in Filamentous Ascomycete Fungi. *Annual Review of Genetics* **34**: 165–186.
- Glassman SI, Peay KG, Talbot JM, Smith DP, Chung JA, Taylor JW, Vilgalys R, Bruns TD. 2015.** A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist* **205**: 1619–1631.
- Glémin S, Bataillon T. 2009.** A comparative view of the evolution of grasses under domestication. *New Phytologist* **183**: 273–290.
- Gross BL, Olsen KM. 2010.** Genetic perspectives on crop domestication. *Trends in Plant Science* **15**: 529–537.
- Gryndler M, Černá L, Bukovská P, Hřelová H, Jansa J. 2014.** *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza* **24**: 603–610.
- Guidot A, Johannesson H, Dahlberg A, Stenlid J. 2003.** Parental tracking in the postfire wood decay ascomycete *Daldinia loculata* using highly variable nuclear gene loci. *Molecular Ecology* **12**: 1717–1730.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003.** Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* **21**: 433–438.
- Healy RA, Smith ME, Bonito GM, Pfister DH, Ge Z-W, Guevara GG, Williams G, Stafford K, Kumar L, Lee T, et al. 2013.** High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology* **22**: 1717–1732.
- Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.
- Hochberg ME, Bertault G, Poitrineau K, Janssen A. 2003.** Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **109**: 147–153.
- Iotti M, Rubini A, Tisserant E, Kholer A, Paolocci F, Zambonelli A. 2012.** Self/nonspecific recognition in *Tuber melanosporum* is not mediated by a heterokaryon incompatibility system. *Fungal Biology* **116**: 261–275.

- Janeau G, Spitz F. 1984.** L'espace chez le sanglier (*Sus scrofa scrofa* L.): occupation et mode d'utilisation. *Gibier faune sauvage*: 73–89.
- Johannesson H, Vasiliauskas R, Dahlberg A, Penttilä R, Stenlid J. 2001.** Genetic differentiation in Eurasian populations of the postfire ascomycete *Daldinia loculata*. *Molecular Ecology* **10**: 1665–1677.
- Korf RP. 1973.** Discomycetes and Tuberales. The Fungi: An Advanced Treatise. New York: Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., Sussman, A.S., 249–319.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW. 2004.** Microsatellite markers reveal the below ground distribution of genets in two species of *Rhizopogon* forming tuberculate ectomycorrhizas on Douglas fir. *New Phytologist* **161**: 313–320.
- Kretzer AM, Dunham S, Molina R, Spatafora JW. 2005.** Patterns of vegetative growth and gene flow in *Rhizopogon vinicolor* and *R. vesiculosus* (Boletales, Basidiomycota). *Molecular Ecology* **14**: 2259–2268.
- Leblois R, Reddy B, Rousset F. 2013.** The Migraine project : A user- friendly software for likelihood-based inferences of spatial structure and demographic history from genetic data
- Levene H. 1949.** On a matching problem arising in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*: 91–94.
- Lian C, Miwa M, Hogetsu T. 2001.** Outcrossing and paternity analysis of *Pinus densiflora* (Japanese red pine) by microsatellite polymorphism. *Heredity* **87**: 88–98.
- Linde CC, Selmes H. 2012.** Genetic Diversity and Mating Type Distribution of *Tuber melanosporum* and Their Significance to Truffle Cultivation in Artificially Planted Truffières in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6534–6539.
- Malloure BD, James TY. 2013.** Inbreeding depression in urban environments of the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus* (Nidulariaceae: Basidiomycota). *Heredity* **110**: 355–362.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, et al. 2010.** Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033–1038.
- Miguel AM (Ana M de, Saez R (Raimundo). 2005.** Algunas micorrizas competidoras de plantaciones truferas.
- Miller AJ, Gross BL. 2011.** From forest to field: Perennial fruit crop domestication. *American Journal of Botany* **98**: 1389–1414.
- Miller SL, Torres P, McClean TM. 1994.** Persistence of Basidiospores and Sclerotia of Ectomycorrhizal Fungi and *Morchella* in Soil. *Mycologia* **86**: 89–95.
- Murat C. 2014.** Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. *Mycorrhiza*: 1–5.
- Murata H, Yamada A, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Shimokawa T. 2012.** Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela odorata*, allowing in vitro synthesis of rhizospheric 'shiro'. *Mycorrhiza* **23**: 235–242.

- Murata H, Yamada A, Yokota S, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Neda H. 2013.** Root endophyte symbiosis in vitro between the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and the arbuscular mycorrhizal plant *Prunus speciosa*. *Mycorrhiza* **24**: 315–321.
- Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F. 2004.** Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* **164**: 401–411.
- Murat C, Riccioni C, Belfiori B, Cichocki N, Labbé J, Morin E, Tisserant E, Paolocci F, Rubini A, Martin F. 2011.** Distribution and localization of microsatellites in the Perigord black truffle genome and identification of new molecular markers. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 592–601.
- Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C, Halkett F, et al. 2013.** Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist* **199**: 176–187.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S. 2006.** Reevaluation of the Life Cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2390–2393.
- Parker KC, Trapnell DW, Hamrick JL, Hodgson WC. 2014.** Genetic and morphological contrasts between wild and anthropogenic populations of *Agave parryi* var. *huachucensis* in south-eastern Arizona. *Annals of Botany* **113**: 939–952.
- Parks JC, Werth CR. 1993.** A Study of Spatial Features of Clones in a Population of Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* (Dennstaedtiaceae). *American Journal of Botany* **80**: 537–544.
- Pellerin M, Picard M, Sonia S, Baubet E, Baltzinger C. 2015.** A cross-comparative approach of long-distance seed dispersal by common wild ungulates.
- Piattoni F, Amicucci A, Iotti M, Ori F, Stocchi V, Zambonelli A. 2014.** Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*. *Fungal Ecology* **9**: 52–60.
- Plattner I, Hall IR. 1995.** Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological Research* **99**: 1367–1370.
- Qi J, Liu X, Shen D, Miao H, Xie B, Li X, Zeng P, Wang S, Shang Y, Gu X, et al. 2013.** A genomic variation map provides insights into the genetic basis of cucumber domestication and diversity. *Nature Genetics* **45**: 1510–1515.
- R Core Team. 2014.** *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Riccioni C, Belfiori B, Rubini A, Passeri V, Arcioni S, Paolocci F. 2008.** *Tuber melanosporum* outcrosses: analysis of the genetic diversity within and among its natural populations under this new scenario. *New Phytologist* **180**: 466–478.
- Rousset. 2000.** Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 58–62.
- Rousset F. 2008.** genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**: 103–106.

- Roy M, Watthana S, Stier A, Richard F, Vessabutr S, Selosse M-A. 2009.** Two mycoheterotrophic orchids from Thailand tropical dipterocarpacean forests associate with a broad diversity of ectomycorrhizal fungi. *BMC Biology* **7**: 51.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011a.** Tuber melanosporum: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist* **189**: 723–735.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011b.** Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete Tuber melanosporum. *New Phytologist* **189**: 710–722.
- Rubini A, Riccioni C, Belfiori B, Paolocci F. 2014.** Impact of the competition between mating types on the cultivation of Tuber melanosporum: Romeo and Juliet and the matter of space and time. *Mycorrhiza* **24**: 19–27.
- Sbrana C, Nuti MP, Giovannetti M. 2007.** Self-anastomosing ability and vegetative incompatibility of Tuber borchii isolates. *Mycorrhiza* **17**: 667–675.
- Seitzman BH, Ouimette A, Mixon RL, Hobbie EA, Hibbett DS. 2010.** Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined stable isotope and phylogenetic analyses. *Mycologia*.
- Selosse M-A. 2003.** Founder effect in a young Leccinum duriusculum (Schultzer) Singer population. *Mycorrhiza* **13**: 143–149.
- Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N. 2009.** Do Sebaciales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* **113**: 1062–1069.
- Selosse M-A, Taschen E, Giraud T. 2013.** Do black truffles avoid sexual harassment by linking mating type and vegetative incompatibility? *New Phytologist* **199**: 10–13.
- Shiu PK, Glass NL. 2000.** Cell and nuclear recognition mechanisms mediated by mating type in filamentous ascomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 183–188.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition*. Amsterdam; Boston: Academic Press.
- Splivallo R, Novero M, Berteà CM, Bossi S, Bonfante P. 2007.** Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **175**: 417–424.
- Stenberg P, Lundmark M, Saura A. 2003.** mlgsim: a program for detecting clones using a simulation approach. *Molecular Ecology Notes* **3**: 329–331.
- Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M. 2012.** Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology* **80**: 1–8.
- Sumner J, Rousset F, Estoup A, Moritz C. 2001.** ‘Neighbourhood’ size, dispersal and density estimates in the prickly forest skink (Gnypetoscincus queenslandiae) using individual genetic and demographic methods. *Molecular Ecology* **10**: 1917–1927.
- Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Bréchet C, Robin C. 2013.** Carbon Transfer from the Host to Tuber melanosporum Mycorrhizas and Ascocarps Followed Using a ¹³C Pulse-Labeling Technique. *PLoS ONE* **8**: e64626.

Tacon FL, Rubini A, Murat C, Riccioni C, Robin C, Belfiori B, Zeller B, Varga HD Ia, Akroume E, Deveau A, et al. 2015. Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Annals of Forest Science*: 1–13.

Taylor DL, Bruns TD. 1999. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* **8**: 1837–1850.

Tedersoo L, Hansen K, Perry BA, Kjølner R. 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytologist* **170**: 581–596.

Těšitelová T, Kotlínek M, Jersáková J, Joly F-X, Košnar J, Tatarenko I, Selosse M-A. 2015. Two widespread green *Neottia* species (Orchidaceae) show mycorrhizal preference for *Sebacinales* in various habitats and ontogenetic stages. *Molecular Ecology* **24**: 1122–1134.

Urban A, Neuner-Plattner I, Krisai-Greilhuber I, Haselwandter K. 2004. Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two *Tuber* species. *Mycological Research* **108**: 749–758.

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

Zambonelli A, Bonito GM (Eds.). 2012. *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Zeder MA. 2008. Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11597–11604.

Zeller B, Bréchet C, Maurice JP, Le Tacon F. 2008. Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ natural abundance. *Annals of forest science*: 1.

Table S1.

Characteristics of the 14 SSRs loci selected for *T. melanosporum* analyses on at each analyses scales (brûlés and truffle ground scale).

SSR	motif	localisation	Size range (bp)	Na*	He**	Retained at brûlé scale	Retained at truffle ground scale
me11	(AG)16	intron	277-308	22	0.441	✓	✓
me13	(AT)13	Intergenic region	81-119	7	0.5	✓	✓
me14	(CT)21	Intergenic region	136-154	8	0.419	✓	✓
me02	(TC)16	Intergenic region	143-177	17	0.556	✓	✓
Tm2	(TAT)15	Intergenic region	129-221	24	0.821	-	-
Tm9	(ATCA)12	Intergenic region	282-338	9	0.547	✓	✓
Tm75	(GAAA)14	Intergenic region	312-352	9	0.528	✓	✓
Tm1	(ATTG)18	Intergenic region	300-361	18	0.601	✓	✓
Tm21	(ATA)26	TE	256-323	17	0.554	✓	-
Tm98	(TAT)15	Intergenic region	199-238	10	0.511	-	✓
Tm127	(TTTA)14	TE	158-222	12	0.257	✓	✓
Tm22	(CCTCAT)17	Intergenic region	291-362	20	0.62	✓	✓
Tm269	(TGTTGC)15	Intergenic region	353-407	14	0.424	✓	✓
me09	(AG)29	Intergenic region	Not clearly lisible	-	-	-	-

*Na: Number of observed alleles and **He: Expected heterozygosity, calculated 1091 samples including ascocarps, ECM and non-ECM roots.

SSR name with « me »: Riccioni et al., 2008.

SSR name with « Tm'': Murat et al., 2010.

Table S2

Probability of multilocus genotypes (*PGen*) and probability of their occurrence resulting from distinct sexual events (*PSex*) for all samples of each of the five studied brûlés (a. SB1; b. SB2; c. PB1; d. PB2; e. PB3), with detailed mating-type, sample types (found as maternal, paternal or ECM sample), number of seasons of persistence, maximum size (calculated as the maximum distance between two samples of the same MLG, in centimeters).

a.

MLG	n	PSex	Significance	Level	PGen	Found as						Persistence (Nb. years) ^a	Max. size MLG
						MT	maternal	paternal	ECM	ECM z1 ^{\$}	ECM z2 ^{\$}		
1	1	-	-	-	0.000186252	1	1	-	-	-	-	1	-
2	1	-	-	-	0.00131472	1	-	-	1	-	-	1	-
3	1	-	-	-	0.00832657	1	-	-	1	-	-	1	-
4	12	0.000159276	0.00335008	**	0.0249797	1	1	-	-	11	-	2	256
5	1	-	-	-	0.000489986	2	-	1	-	-	-	1	-
6	1	-	-	-	0.011796	1	1	-	-	-	-	1	-
7	3	0.645307	0.82946	ns	0.0244993	2	-	3	-	-	-	2	214
8	34	3.77476e-015	0	***	0.0353879	1	8	-	26	-	-	2	440
9	1	-	-	-	0.00372504	1	-	1	-	-	-	1	-
10	1	-	-	-	0.0244993	2	-	1	-	-	-	1	-
11	3	0.860068	0.954355	ns	0.0353879	1	1	1	1	-	-	1	323
12	6	0.937065	0.977596	ns	0.073498	2	-	5	1	-	-	2	478
13	59	0	0	***	0.106164	1	9	-	14	21	15	3	495
14	1	-	-	-	0.00489986	2	-	1	-	-	-	1	-
15	2	-	-	ns	0.00489986	2	1	-	-	-	-	1	160
16	1	-	-	-	0.000122804	2	-	1	-	-	-	1	-
17	1	-	-	-	0.00293879	1	1	-	-	-	-	1	-
18	1	-	-	-	0.00864682	2	-	1	-	-	-	1	-

19	1	-	-	-	3.39091e-005	2	1	-	-	-	-	1	-
20	1	-	-	-	0.00065736	1	1	-	-	-	-	1	-
21	1	-	-	-	0.00624492	1	1	-	-	-	-	1	-
22	1	-	-	-	0.00558756	1	1	-	-	-	-	1	-

[§]Fine scale ECM sampling [‡] Sampled over three seasons (2011; 2012; not sampled; 2014).

*** PValue(0.01)= 0.000761107, significance level= 0.00994556

** PValue(0.05)= 0.00691498, significance level= 0.0499372

* PValue(0.10)= 0.0205954, significance level= 0.0999267

b.

MLG	n	PSex	Significance	Level	PGen	MT	Found as			Persistence (Nb. years) [‡]	Max. size MLG
							maternal	paternal	Non-ECM roots		
1	1	-	-	-	0.000252971	1	1	-	-	1	-
2	1	-	-	-	0.000180694	2	-	1	-	1	-
3	2	0.00140239	0.29142	ns	0.00151783	1	2	-	-	1	438.73
4	1	-	-	-	0.0001056	2	1	-	-	1	-
5	1	-	-	-	0.00619522	2	-	1	-	1	-
6	3	0.000523162	0.180473	ns	0.00433665	1	3	-	-	2	204.02
7	1	-	-	-	0.00433665	2	-	1	-	1	-
8	1	-	-	-	0.00151783	2	-	1	-	1	-
9	3	3.948e-009	0	***	8.21336e-005	2	-	-	3	1	0 (same root)
10	1	-	-	-	0.000172481	1	1	-	-	1	-
11	1	-	-	-	0.00379457	2	-	1	-	1	-
12	1	-	-	-	4.31201e-005	1	-	1	-	1	-
13	1	-	-	-	3.84001e-005	2	-	-	1	1	-
14	15	1.55431e-015	0	***	2.56001e-005	2	2	-	13	2	213.69
15	1	-	-	-	1.79201e-005	2	-	1	-	1	-
16	1	-	-	-	0.000563202	2	1	-	-	1	-

17 1 - - - 0.000394241 1 - 1 - 1 -

[‡] Sampled over four seasons (2011; 2012; 2013; 2014) but no sample was successfully identified in 2014.

*** PValue(0.01)= 1.1535e-005, significance level= 0.00887574

** PValue(0.05)= 8.16077e-005, significance level= 0.0488166

* PValue(0.10)= 0.000182868, significance level= 0.0991124

c.

MLG	n	PSEX	Significance	Level	PGen	MT	maternal	Found as paternal	ECM	Persistence (Nb. years) [‡]	Max. size MLG
1	1	-	-	-	4.9314e-005	1	-	1	-	1	-
2	4	9.52016e-013	0	***	3.67666e-005	2	4	-	-	1	309.09
3	1	-	-	-	0.000159322	1	-	1	-	1	-
4	1	-	-	-	0.000853192	1	-	1	-	1	-
5	1	-	-	-	0.00295336	1	-	1	-	1	-
6	1	-	-	-	0.00379717	1	-	1	-	1	-
7	1	-	-	-	0.00759435	1	-	1	-	1	-
8	1	-	-	-	0.0127979	1	-	1	-	1	-
9	1	-	-	-	1.6438e-005	2	-	-	1	1	-
10	1	-	-	-	0.00590672	1	-	1	-	1	-
11	37	0	0	***	0.00590672	2	24	-	13	3	382.41
12	4	0.0710792	0.473286	ns	0.0255958	1	-	4	-	1	302.64
13	1	-	-	-	0.0329088	1	-	1	-	1	-
14	4	0.0145043	0.213365	ns	0.0153575	1	-	4	-	2	285.81
15	1	-	-	-	0.00455661	1	-	1	-	1	-
16	1	-	-	-	0.000477966	1	-	1	-	1	-

[‡] Sampled over four seasons (2011; 2012; 2013; 2014) but no sample was successfully identified in 2014.

*** PValue(0.01)= 0.000178848, significance level= 0.00979213

** PValue(0.05)= 0.00141513, significance level= 0.0498196

* PValue(0.10)= 0.0049838, significance level= 0.099811

d.

MLG	n	PSEX	Significance	Level	PGen	MT	Found as		Persistence (Nb. years) [†]	Max. size MLG
							maternal	paternal		
1	1	-	-	-	1.17928e-006	1	-	1	1	-
2	1	-	-	-	7.86188e-005	1	-	1	1	-
3	1	-	-	-	0.00120385	2	1	-	1	-
4	1	-	-	-	1.19697e-007	1	-	1	1	-
5	1	-	-	-	0.000152613	1	-	1	1	-
6	1	-	-	-	0.0022892	1	-	1	1	-
7	3	0.00645431	0.313125	ns	0.00648605	1	-	3	2	96.04
8	1	-	-	-	0.00534146	1	-	1	1	-
9	1	-	-	-	0.00605365	1	-	1	1	-
10	1	-	-	-	0.000361155	2	1	-	1	-
11	1	-	-	-	0.000773904	2	1	-	1	-
12	1	-	-	-	0.000291352	1	-	1	1	-
13	23	0	0	***	0.00541733	2	23	-	3	313.92
14	6	8.4041e-005	0.0353149	*	0.0123825	1	-	6	2	223.99
15	1	-	-	-	0.000361155	2	1	-	1	-
16	1	-	-	-	0.000361155	2	1	-	1	-
17	1	-	-	-	6.47449e-006	1	-	1	1	-
18	1	-	-	-	8.96837e-006	1	1	-	1	-
19	1	-	-	-	6.64715e-006	1	-	1	1	-
20	2	3.24555e-008	0	***	4.43143e-006	1	-	2	1	136.97
21	6	0	0	***	3.8775e-005	2	6	-	1	249.70
22	1	-	-	-	0.000332357	1	-	1	1	-
23	1	-	-	-	0.000815786	1	-	1	1	-

[†] Sampled over four seasons (2011; 2012; 2013; 2014) but there was no fructification in 2014.

*** PValue(0.01)= 7.45989e-006, significance level= 0.0094173

** PValue(0.05)= 0.000170245, significance level= 0.0494408

* PValue(0.10)= 0.000574068, significance level= 0.0994703

e.

MLG	n	PSEX	Significance	Level	PGen	MT	Found as		Persistence (Nb. years) [‡]	Max. size MLG
							maternal	paternal		
1	1	-	-	-	0.000689998	2	-	1	1	-
2	1	-	-	-	0.000147857	2	-	1	1	-
3	1	-	-	-	0.0129375	2	-	1	1	-
4	14	0	0	***	0.00431249	1	14	-	2	201.1
5	1	-	-	-	0.00862498	2	-	1	1	-
6	1	-	-	-	0.000689998	1	1	-	1	-
7	1	-	-	-	0.00776248	2	-	1	1	-
8	1	-	-	-	3.16836e-005	2	-	1	1	-

[‡] Sampled over four seasons (2011; 2012; 2013; 2014), with only one fructification in 2014.

*** PValue(0.01)= 1.27129e-005, significance level= 0.00902527

** PValue(0.05)= 0.000113704, significance level= 0.0487365

* PValue(0.10)= 0.00025464, significance level= 0.0974729

Table S3. MLGs details (persistence, size) with probabilities (P_{Sex} and P_{Gen}) at truffle ground scale for
a. SG1, b. SG2, c. PG1, d. PG2.

a. SG1

MLG	Nb. ascocarps	P _{Sex}	Significance	Level	P _{Gen}	MT	Nb. brûlés	Nb. seasons	Max. distance (m)
1	1	-	-	-	2.41836e-009	2	1	1	-
2	1	-	-	-	7.39131e-009	1	1	1	-
3	1	-	-	-	2.18603e-005	1	1	1	-
4	1	-	-	-	3.79398e-005	1	1	1	-
5	1	-	-	-	3.62536e-005	1	1	1	-
6	1	-	-	-	3.80869e-005	1	1	1	-
7	3	2.82527e-007	0.00560538	**	7.9726e-005	2	1	2	8.380483
8	1	-	-	-	1.81195e-006	1	1	1	-
9	1	-	-	-	1.72385e-007	2	1	1	-
10	2	7.87937e-008	0.00336323	**	2.63805e-006	2	1	1	10.470912
11	2	0.00259443	0.652466	ns	0.000490399	1	1	2	4.472136
12	2	2.45373e-005	0.0941704	ns	4.66553e-005	2	1	1	4.167733
13	1	-	-	-	0.000276504	2	1	1	-
14	1	-	-	-	0.000393486	2	1	1	-
15	1	-	-	-	2.1352e-005	1	1	1	-
16	16	3.44169e-015	0	***	0.000306045	2	5	2	168.480414
17	4	3.24347e-007	0.00560538	**	0.000357052	1	2	1	176.116559
18	1	-	-	-	2.36078e-006	2	1	1	-
19	1	-	-	-	2.12896e-005	1	1	1	-
20	1	-	-	-	0.000151477	1	1	1	-
21	1	-	-	-	2.79948e-007	1	1	1	-
22	1	-	-	-	7.19866e-007	1	1	1	-
23	11	0	0	***	1.35746e-005	2	3	2	59.554218
24	1	-	-	-	1.84152e-007	1	1	1	-
25	1	-	-	-	9.02343e-006	1	1	1	-
26	1	-	-	-	1.0558e-005	2	1	1	-
27	1	-	-	-	0.000146493	1	1	1	-
28	2	4.04651e-007	0.00560538	**	5.97929e-006	2	1	2	10.404384
29	1	-	-	-	3.27132e-007	1	1	1	-
30	1	-	-	-	4.92333e-005	1	1	1	-
31	1	-	-	-	9.77586e-008	1	1	1	-
32	8	3.88578e-015	0	***	4.79017e-006	1	2	2	144.905831
33	1	-	-	-	9.00288e-007	2	1	1	-
34	1	-	-	-	2.66906e-010	2	1	1	-
35	1	-	-	-	1.6591e-006	1	1	1	-
36	1	-	-	-	1.5485e-005	2	1	1	-
37	5	8.43769e-015	0	***	2.70987e-005	1	1	2	16.920106
38	1	-	-	-	2.77289e-005	1	1	1	-
39	1	-	-	-	0.000596171	2	1	1	-
40	2	3.23353e-006	0.029148	*	1.69116e-005	2	1	1	2.102380
41	1	-	-	-	1.9654e-005	2	1	1	-

42	1	-	-	-	4.79923e-005	2	1	1	-
43	1	-	-	-	0.000336302	2	1	1	-
44	1	-	-	-	2.21702e-005	1	1	1	-
45	1	-	-	-	2.73724e-006	2	1	1	-
46	29	0	0	***	0.000305018	1	2	2	80.695043
47	1	-	-	-	0.000203345	2	1	1	-
48	1	-	-	-	5.33456e-006	1	1	1	-
49	1	-	-	-	0.000100595	2	1	1	-
50	3	9.14294e-011	0	***	5.45862e-006	1	1	1	11.443465
51	3	1.42908e-012	0	***	1.36466e-006	1	1	2	12.100417
52	1	-	-	-	1.36466e-006	1	1	1	-
53	1	-	-	-	0.00013692	1	1	1	-
54	1	-	-	-	9.12803e-005	1	1	1	-
55	1	-	-	-	3.65799e-005	2	1	1	-
56	8	1.77636e-015	0	***	2.43157e-005	1	1	2	9.570397
57	1	-	-	-	0.000286745	2	1	1	-
58	1	-	-	-	2.49833e-005	2	1	1	-
59	1	-	-	-	9.61757e-006	2	1	1	-
60	1	-	-	-	3.85474e-007	2	1	1	-
61	1	-	-	-	1.72219e-006	1	1	1	-
62	2	3.13465e-011	0	***	5.26148e-008	2	1	1	5.978202
63	1	-	-	-	1.05579e-006	2	1	1	-
64	1	-	-	-	1.2604e-006	1	1	1	-
65	1	-	-	-	3.26805e-005	1	1	1	-

*** PValue(0.01)= 8.87913e-007, significance level= 0.00896861

** PValue(0.05)= 6.94306e-006, significance level= 0.0493274

* PValue(0.10)= 2.87916e-005, significance level= 0.0986547

b. SG2

MLG	Nb. ascocarps	PSEX	Significance	Level	PGen	MT	Nb. brûlés	Nb. seasons	Max. distance (m)
1	2	6.09118e-007	0.00344234	**	1.76667e-005	2	2	1	3.9
2	1	-	-	-	9.88106e-006	2	1	1	-
3	1	-	-	-	0.000130091	1	1	1	-
4	5	2.13947e-011	0	***	0.000314789	1	2	2	4.8
5	3	4.60652e-007	0.00172117	**	0.000227143	1	2	2	7
6	4	3.44169e-015	0	***	5.67858e-006	1	1	1	2
7	3	0.000376176	0.230637	ns	0.00218626	2	1	2	3.8
8	1	-	-	-	2.23594e-005	1	1	1	-
9	2	5.81312e-005	0.0688468	ns	0.000173134	1	1	1	0.3
10	1	-	-	-	4.1643e-005	2	1	1	-
11	24	1.22125e-015	0	***	2.57639e-007	2	4	2	37.9
12	2	5.87566e-007	0.00344234	**	1.73512e-005	2	1	1	0.1
13	3	4.45539e-006	0.00860585	**	0.000485834	2	1	1	0.4

14	3	1.80118e-005	0.0292599	*	0.000777335	1	1	2	2.6
15	1	-	-	-	0.000999431	2	1	1	-
16	1	-	-	-	0.000483675	1	1	1	-
17	5	2.13799e-010	0	***	0.000499715	2	1	2	1.7
18	1	-	-	-	2.27712e-007	2	1	1	-

*** PValue(0.01)= 4.81195e-006, significance level= 0.00860585

** PValue(0.05)= 3.28777e-005, significance level= 0.0481928

* PValue(0.10)= 7.65261e-005, significance level= 0.0981067

c. PG1

MLG	Nb. ascocarps	PSEX	Significance	Level	PGen	MT	Nb. brûlés	Nb. seasons	Max. distance (m)
1	1	-	-	-	4.87959e-005	2	1	1	-
2	3	8.38818e-009	0	***	4.50684e-005	2	1	2	0.19
3	1	-	-	-	9.32249e-006	1	1	1	-
4	1	-	-	-	0.000136341	2	1	1	-
5	4	0	0	***	2.62942e-006	1	1	2	0.62
6	16	0	0	***	2.79862e-005	1	4	2	54.17
7	4	0	0	***	2.02663e-008	1	1	2	0.56
8	1	-	-	-	6.09948e-006	2	1	1	-
9	4	0	0	***	4.83971e-006	1	1	2	0.55
10	12	0	0	***	7.1317e-005	1	1	2	2.01
11	1	-	-	-	0.000213951	1	1	1	-
12	3	7.42033e-009	0	***	4.32622e-005	2	1	2	0.54
13	1	-	-	-	0.000196122	2	1	1	-
14	1	-	-	-	0.000789973	1	1	1	-
15	3	0.000157734	0.11985	ns	0.00122707	2	1	1	0.49
16	3	2.89382e-009	0	***	3.16002e-005	2	1	1	1.61
17	3	9.25648e-010	0	***	2.1607e-005	1	1	2	0.41
18	1	-	-	-	9.34912e-005	2	1	1	-
19	1	-	-	-	1.17033e-005	1	1	1	-
20	1	-	-	-	0.000128736	1	1	1	-
21	1	-	-	-	1.01658e-006	2	1	1	-
22	3	1.13849e-010	0	***	1.0743e-005	1	1	2	0.5
23	3	1.44329e-015	0	***	3.6205e-007	2	1	2	0.3
24	1	-	-	-	1.50141e-005	2	1	1	-
25	1	-	-	-	5.56405e-005	1	1	1	-
26	1	-	-	-	9.14706e-005	1	1	1	-
27	1	-	-	-	8.27984e-009	2	1	1	-
28	2	2.37699e-007	0.00499376	**	8.35951e-006	1	1	1	1.68
29	5	1.24489e-012	0	***	0.0001341	1	1	2	0.85

*** PValue(0.01)= 1.14984e-006, significance level= 0.00873908

** PValue(0.05)= 1.43405e-005, significance level= 0.0486891

* PValue(0.10)= 8.3982e-005, significance level= 0.0986267

d. PG2

MLG	Nb. ascocarps	PSex	Significance	Level	PGen	MT	Nb. brûlés	Nb. seasons	Max. distance (m)
1	2	1.41547e-006	0.00284765	**	2.87782e-005	2	1	1	0.6
2	1	-	-	-	4.03776e-005	1	1	1	-
3	3	1.09422e-009	0	***	3.2302e-005	1	1	1	1
4	1	-	-	-	1.87514e-005	2	1	1	-
5	1	-	-	-	0.000166028	2	1	1	-
6	4	0.000879538	0.1215	ns	0.00717241	2	1	2	3.2
7	1	-	-	-	0.000170772	2	1	1	-
8	6	1.29871e-007	0.000949217	***	0.00388506	2	1	1	2.9
9	2	8.51439e-006	0.00711913	**	7.06374e-005	2	1	1	2
10	8	1.44329e-015	0	***	0.000126572	2	1	2	3.4
11	1	-	-	-	0.00168763	2	1	1	-
12	1	-	-	-	7.67103e-005	2	1	1	-
13	1	-	-	-	0.00152627	1	1	1	-
14	1	-	-	-	0.00143448	2	1	1	-
15	4	3.5024e-011	0	***	9.3757e-005	2	1	1	1.7
16	1	-	-	-	0.000363398	1	1	1	-
17	1	-	-	-	0.00034688	1	1	1	-
18	9	7.82002e-010	0	***	0.00763136	1	1	2	7.2
19	4	2.30949e-006	0.00379687	**	0.00152627	1	1	1	1.9
20	1	-	-	-	0.000381568	1	1	1	-
21	1	-	-	-	0.00228941	1	1	1	-
22	2	0.00441458	0.226388	ns	0.00165749	1	1	1	2.5
23	1	-	-	-	0.000126572	2	1	1	-
24	1	-	-	-	0.000508757	1	1	1	-
25	1	-	-	-	2.60436e-006	2	1	1	-
***	PValue(0.01)= 1.55912e-005, significance level= 0.00949217								
**	PValue(0.05)= 0.000267587, significance level= 0.0493593								
*	PValue(0.10)= 0.000623119, significance level= 0.0996678								

Table S4. Analyses on non-ECM roots.

a. Preliminary sampling of 45 non-ECM plant species to test the presence of *T. melanosporum*, with specific primers. Plants are growing on one planted (site PG1, Viols-le-Fort, 43° 44' 39" N, 3° 42' 20" E) and two natural (on site SB1, Pezilla-de-Conflent, 42° 44' 21" N, 2° 28' 57" E and on site SB2, Tourbes, 43° 26' 48" N, 3° 22' 46" E) truffle grounds. Samples in bold were genotyped (see Table **b.**).

Species/ Site	Nb. individuals			Positive individuals			Nb. root fragments			Nb. positive root fragments		
	SB2	SB1	PG1	SB2	SB1	PG1	SB2	SB1	PG1	SB2	SB1	PG1
<i>Alyssum calycinum</i>		2			1			8			2	
<i>Arabis hirsuta</i>		2			1			8			1	
<i>Arenaria serpyllifolia</i>		2			2			8			3	
<i>Triticum durum</i>			12			9			60			10
<i>Brachypodium phoeniceum</i>		2			2			8			3	
<i>Bromus erectus</i>	2			2			6			4		
<i>Bromus intermedius</i>			2			2			11			6
<i>Bromus tectorum</i>	2			2			8			8		
<i>Bupleurum fruticosum</i>		2			2			12			4	
<i>Catapodium rigidum</i>	1	2		1	2		6	8		5	6	
<i>Centhrantus calcitrapa</i>		2			2			8			2	
<i>Cerastium sp.</i>	2			2			6			5		
<i>Silybum sp.</i>	2			2			9			5		
<i>Erodium sp.</i>	2			2			7			4		
<i>Erophila verna</i>	1			1			3			2		
<i>Euphorbia helioscopia</i>	1			1			4			3		
<i>Euphorbia nicaensis</i>	1			1			4			3		
<i>Geranium robertianum</i>	2 + 4		4	1 + 4		4	9 + 19		10	6 + 9		8
<i>Geranium rotundifolium</i>		2			2			8			6	
<i>Hedera helix</i>	2	2	4	2	1	3	7	8	12	3	1	5
<i>Hieracium sp.</i>	2			2			8			6		
<i>Holcus lanatus</i>		2			1			8			2	
<i>Linaria simplex</i>		2			1			8			2	
<i>Linaria supina</i>	2			2			7			5		
<i>Medicago sp.1</i>	4			4			14			8		
<i>Medicago sp.2</i>		2			2			8			4	
<i>Papaver rhoeas</i>		2			2			8			5	
<i>Pimpinella sp.</i>		2			2			8			5	
<i>Psoralea bituminosa</i>	1	2		1	2		4	8		3	5	
<i>Reseda alba</i>		2			2			8			4	
<i>Reseda phyteuma</i>	1			1			7			5		
<i>Rosa canina</i>	2			1			5			2		
<i>Rubia peregrina</i>	2	2		2	1		8	8		3	1	
<i>Sedum sp.</i>	2			2			8			5		
<i>Sedum brevifolium</i>			2			2			6			4
<i>Sedum sediforme</i>	1	2		1	1		7	8		4	1	
<i>Senecio capensis</i>		2			2			8			3	
<i>Silene sp.1</i>		2			2			8			3	

<i>Silene sp.2</i>	2			2			8		4		
<i>Spartium junceum</i>	2			1			6		2		
<i>Stachys recta</i>		2			2			8		3	
<i>Thymus vulgaris</i>		2			2			8		4	
<i>Verbascum sp.</i>		2			2			8		2	
<i>Veronica cymbalaria</i>	2			1			8		3		
<i>Viola sp.</i>		2			1			8		2	
Total	41	48	24	37	40	20	178	196	99	107	74 33

b. MLG and mating type identification (ni, non-identified) on non-ECM root fragments showing positive *T. melanosporum* signal with specific primers. Samples were collected in spring 2013 on 16m² of brûlé SB2 (see samples in bold, red in panel **a**). When present at less than 20 cm, MLG and mating type of closest ascocarps are given.

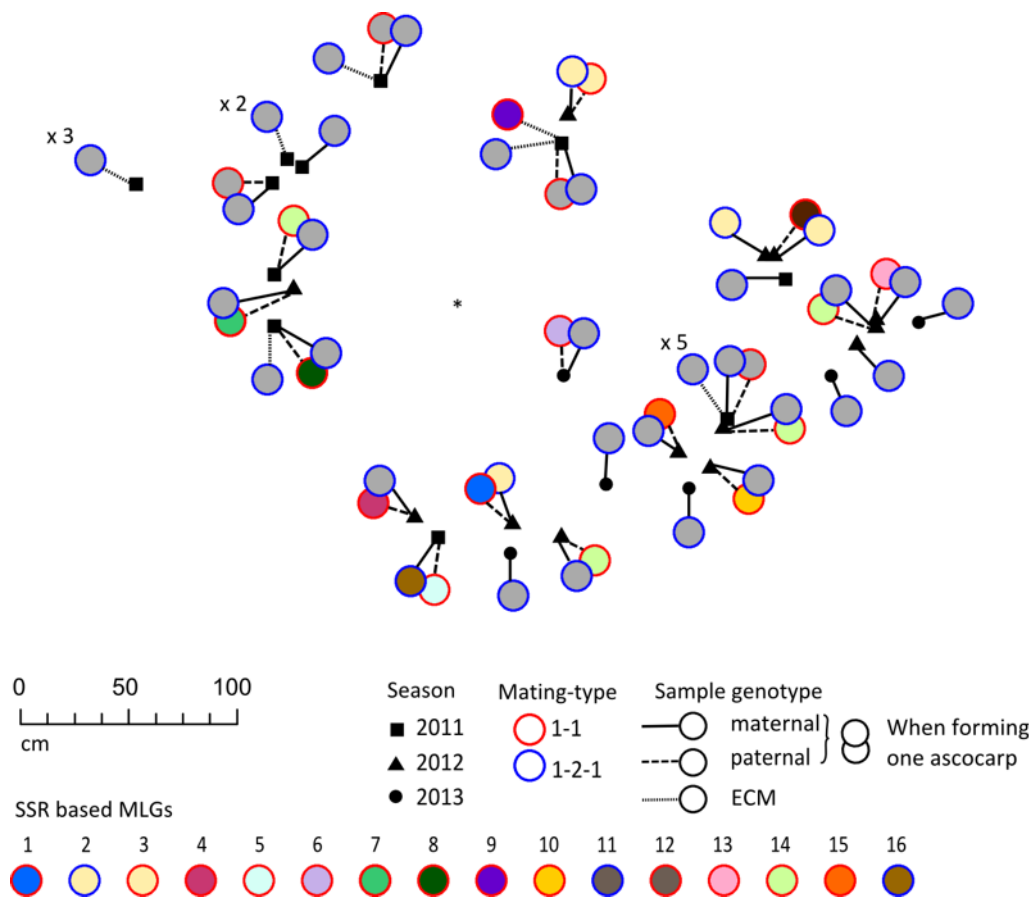
Host species, plant individual	Roots fragments		Maternal MLG on nearest ascocarp	Maternal MT of nearest ascocarp	Paternal MLG on nearest ascocarp	Paternal MT of nearest ascocarp	Corresp. on map (Fig.2.b.)
	MLG	MT					
<i>G. robertianum</i> , ind. 2	MLG14	2					
	MLG14	2	-	-	-	-	a
	MLG14	2					
<i>G. robertianum</i> , ind. 3	ni	ni	-	-	-	-	x
	ni	ni					
<i>G. robertianum</i> , ind.4	MLG9	2	-	-	-	-	g
	MLG9	2					
<i>Sedum sediformis</i>	MLG14	2					
	MLG14	2	A216: 10	A216 :2	A216: ni	A216 :ni	b
	ni	ni	A217: 4	A217: 4	A217: 12	A217: 1	
	ni	ni					
<i>Catapodium rigidum</i>	MLG14	2					
	MLG14	2					
	MLG14	2	A216: 10	A216 :2	A216: ni	A216 :ni	c
	MLG14	2	A217: 4	A217: 4	A217: 12	A217: 1	
	ni	ni					
<i>Reseda phyteuma</i>	MLG14	2					
	MLG14	2					
	MLG14	2	-	-	-	-	d
	ni	ni					
	ni	ni					
<i>Erophila verna</i>	MLG9	2	-	-	-	-	f
	MLG9	2					

c. Fungal ITS sequences recovered from non-ECM roots and closest blast on NCBI Genbank. These sequences were obtained by amplifying and tentatively sequencing 79 randomly chosen samples from Table 1, and the present table displays the ITS of *T. melanosporum* and of the nine other ECM fungi recovered from a total of 31 roots with sequencable PCR products.

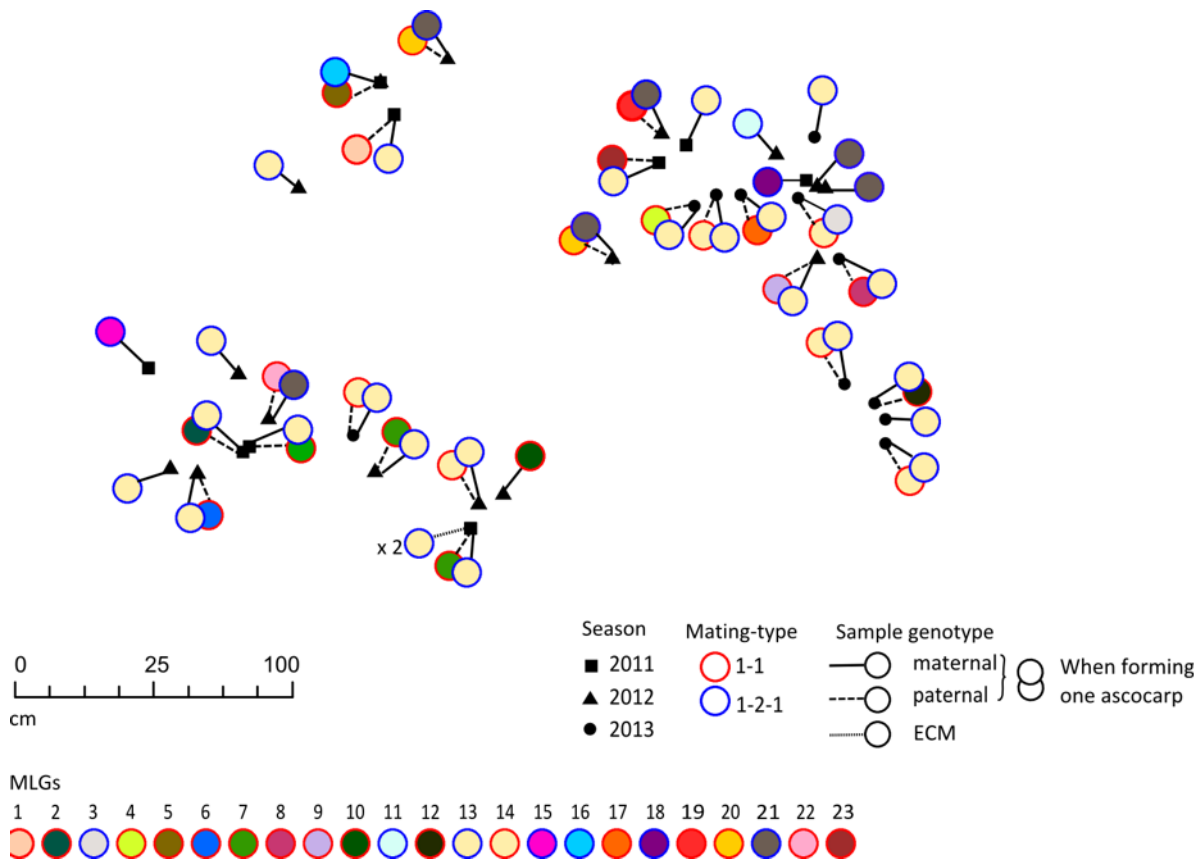
Site	Fungal ITS Closest BLAST match (e-value)	Max. identity	Consensus taxon	Accession number	Plant species (Nb. root samples)
SB1	JQ665543.1 <i>Sebacina incrustans</i> (0.0)	99%	<i>Sebacina incrustans</i>	XXX-XXXX	<i>Viola</i> sp. (2)
	KJ789948.1 Pezizales (0.0)	87%	Pezizales sp.	XXX-XXXX	<i>Pimpinella</i> sp. (1)
	JX630358.1 <i>Tomentella</i> (0.0)	97%	<i>Tomentella fuscocinerea</i>	XXX-XXXX	<i>Pimpinella</i> sp. (1)
	JQ318599.1 Thelephoraceae (0.0)	95%	<i>Thelephoraceae</i> sp.	XXX-XXXX	<i>Hedera helix</i> (1)
	GU979083.1 <i>Tuber melanosporum</i> (0.0)	99%	<i>Tuber melanosporum</i>	XXX-XXXX	<i>Catapodium rigidum</i> (1) <i>Bupleurum fruticosum</i> (1) <i>Papaver rhoeas</i> (1) <i>Alyssum calycinum</i> (1)
SB2	HQ604503.1 <i>Inocybe splendens</i> (0.0)	87%	<i>Inocybe</i> sp.	XXX-XXXX	<i>Bromus erectus</i> (1)
	KF000633.1 Thelephorales (0.0)	99%	<i>Thelephoraceae</i> sp.	XXX-XXXX	<i>Rosa canina</i> (1)
	HE687142.1 Thelephoraceae (0.0)	99%	<i>Thelephoraceae</i> sp.	XXX-XXXX	<i>Medicago</i> sp. (1)
	GU327419.1 Pyronemataceae (0.0)	93%	Pezizomycetes sp.	XXX-XXXX	<i>Veronica cymbalaria</i> (1)
	FJ904165.1 <i>Inocybe umbrinella</i> 2E-152	82%	<i>Inocybe</i> sp.	XXX-XXXX	<i>Spartium junceum</i> (1)
	KF742777.1 <i>Tuber melanosporum</i> (0.0)	99%	<i>Tuber melanosporum</i>	XXX-XXXX	<i>Geranium robertianum</i> (3)
					<i>Cerastium</i> sp. (2)
					<i>Sedum reflexum</i> . (1)
					<i>Hedera helix</i> (1)
					<i>Medicago</i> sp. (1)
					<i>Psoralea bituminosa</i> (1)
					<i>Erodium</i> sp. (1)
					<i>Hieracium</i> sp. (1)
PG3	KM659871.1 <i>Tuber melanosporum</i> (0.0)	99%	<i>Tuber melanosporum</i>	XXX-XXXX	<i>Geranium robertianum</i> (3)
					<i>Bromus intermedius</i> (3)

Figure S1.– Maps of ascocarps and ECM MLGs on planted brûlés (PB1, PB2, PB3).

a. SB1



b. PB2



c.

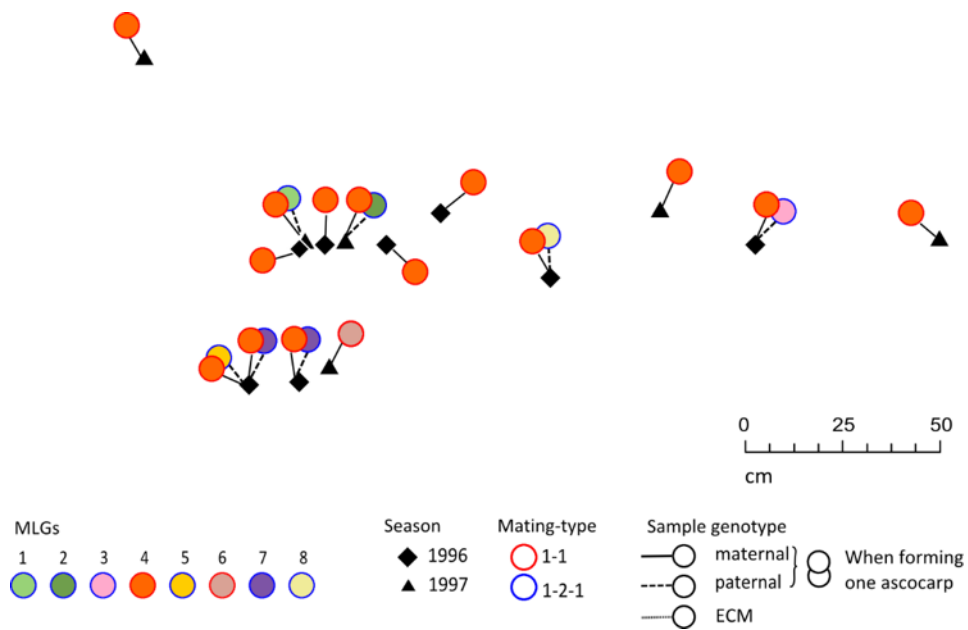
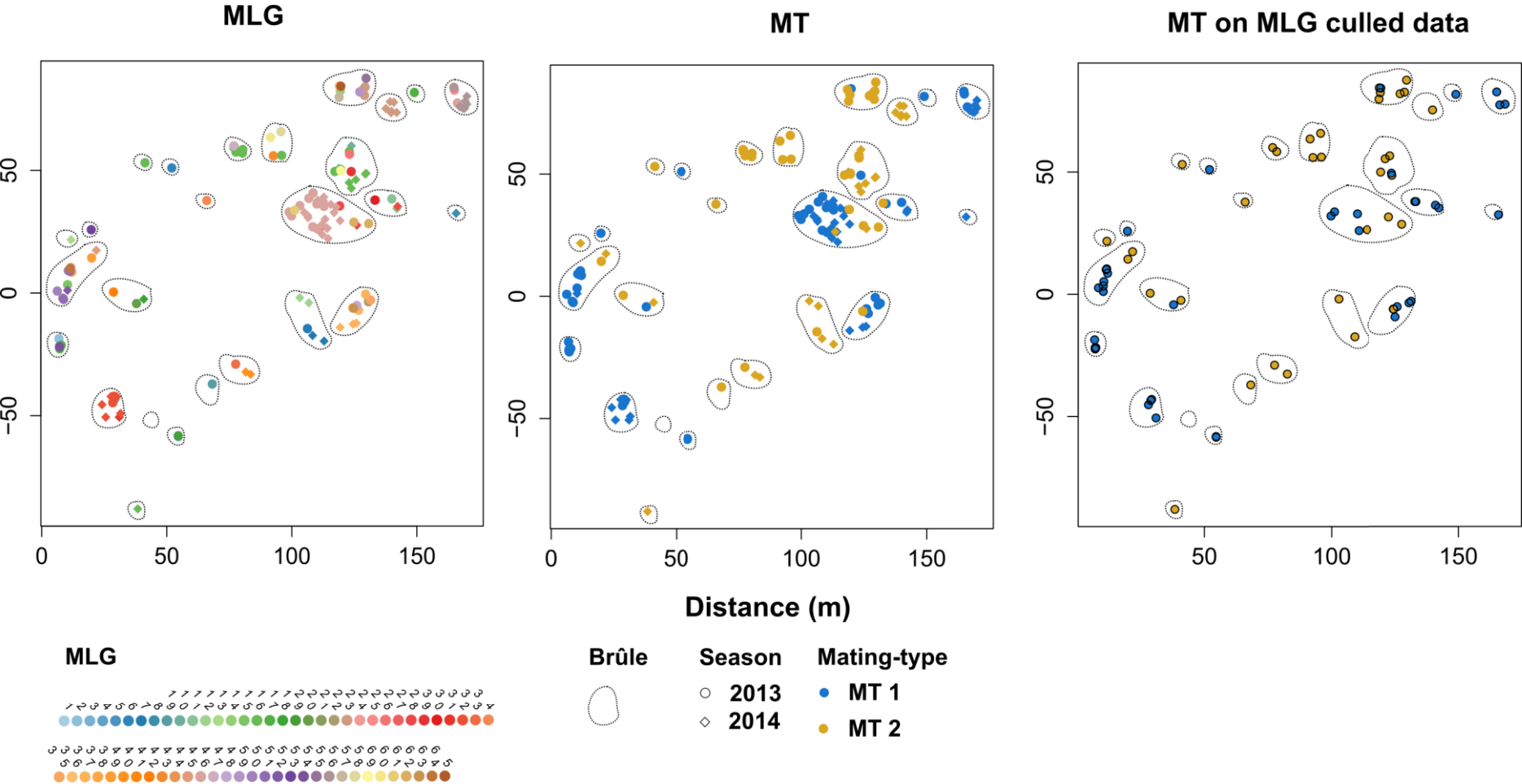
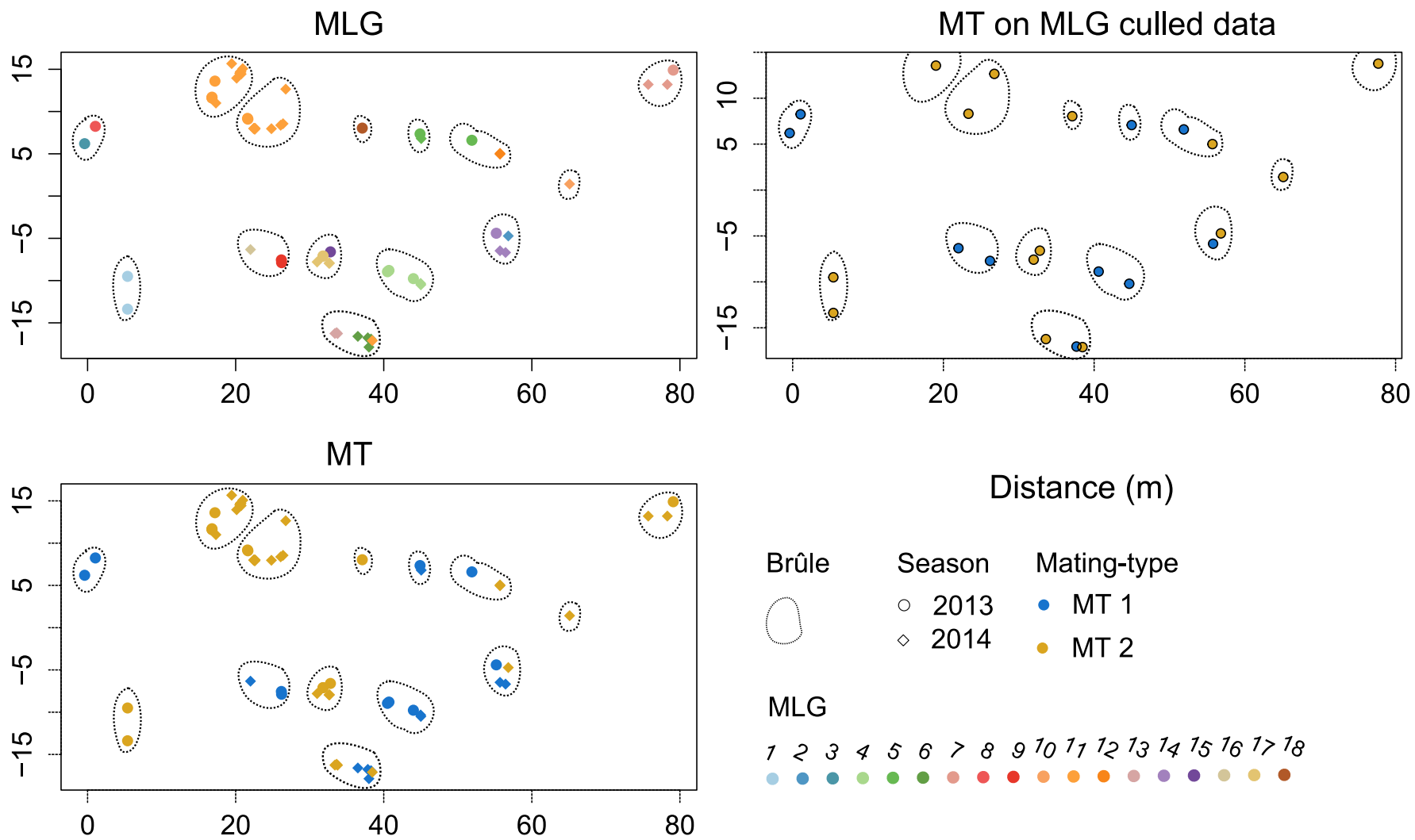


Figure. S2 – Maps of ascocarp MLGs (including fruiting seasons), MT and MT on culled MLG data on each studied truffle ground (SG1; SG2; PG1; PG2).

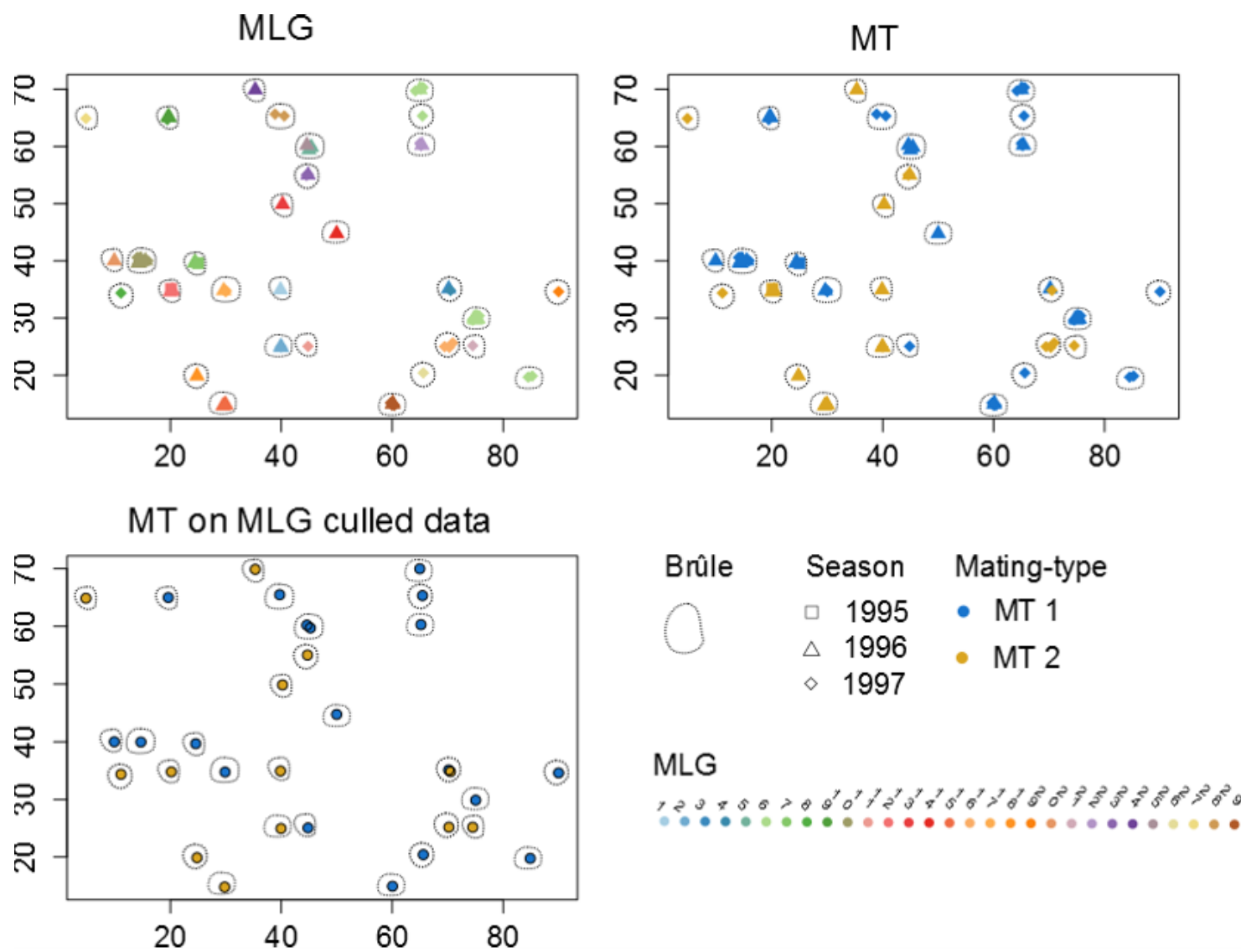
a. SG1



b. SG2



c. PG1



d. PG2

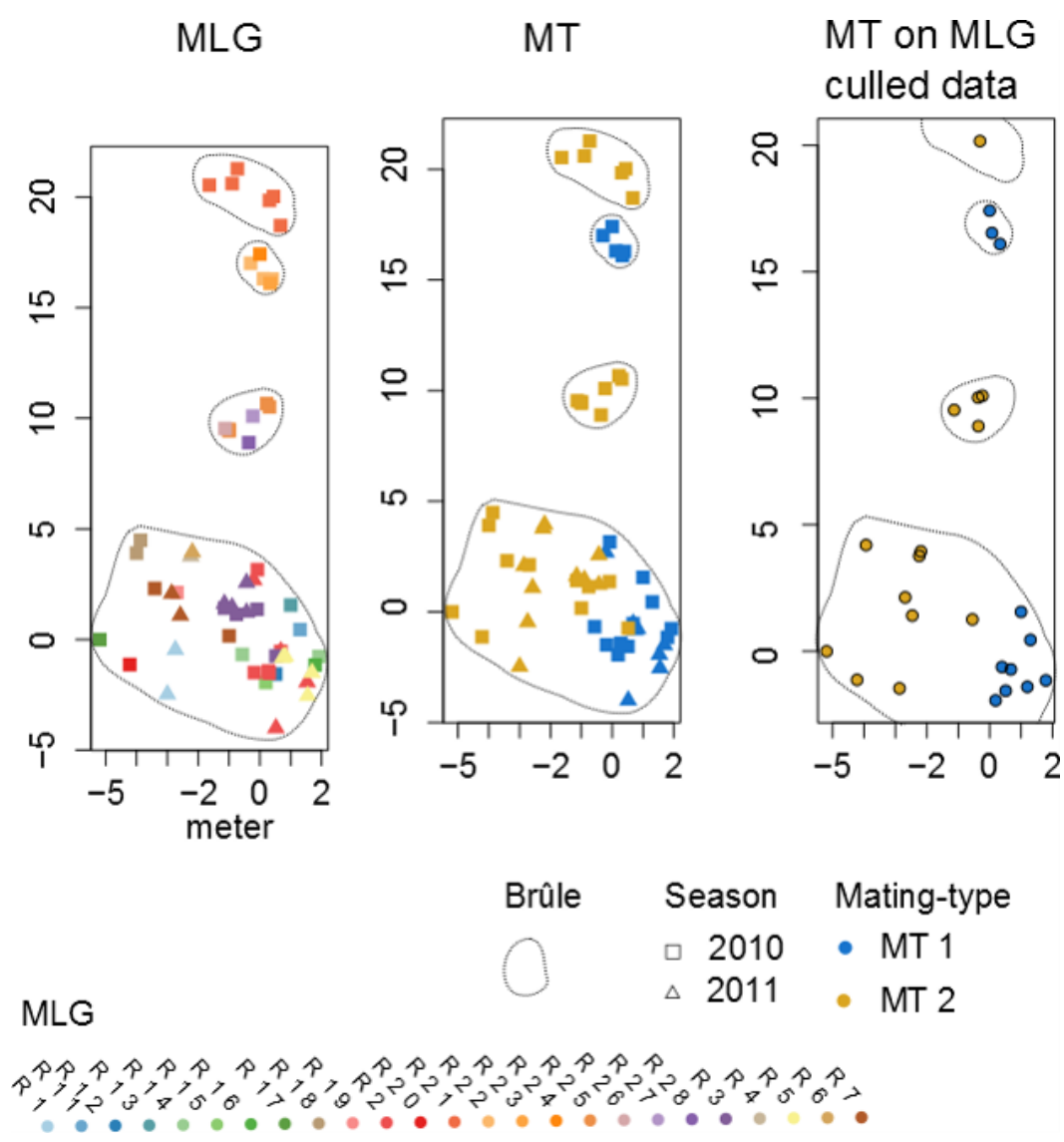
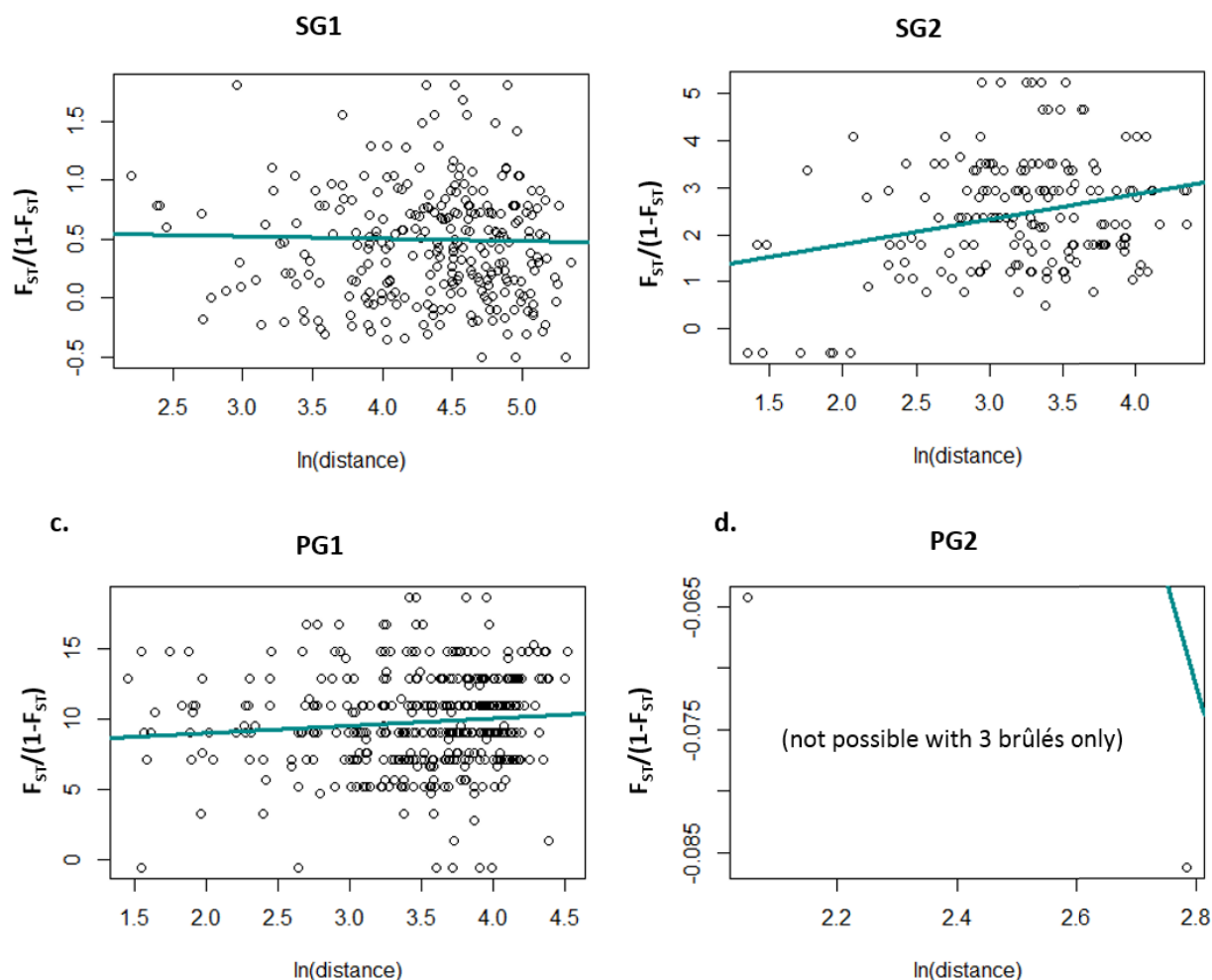
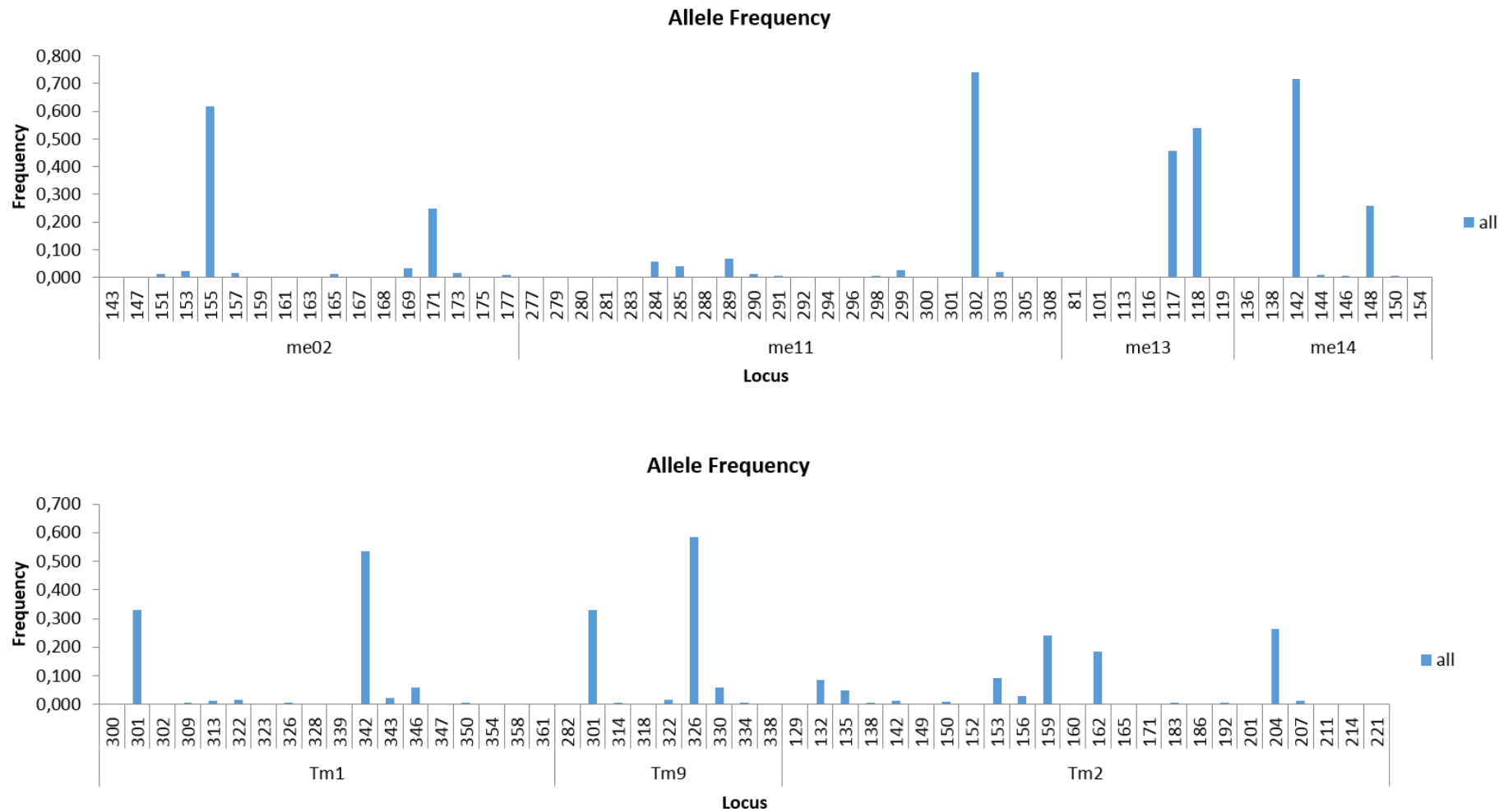


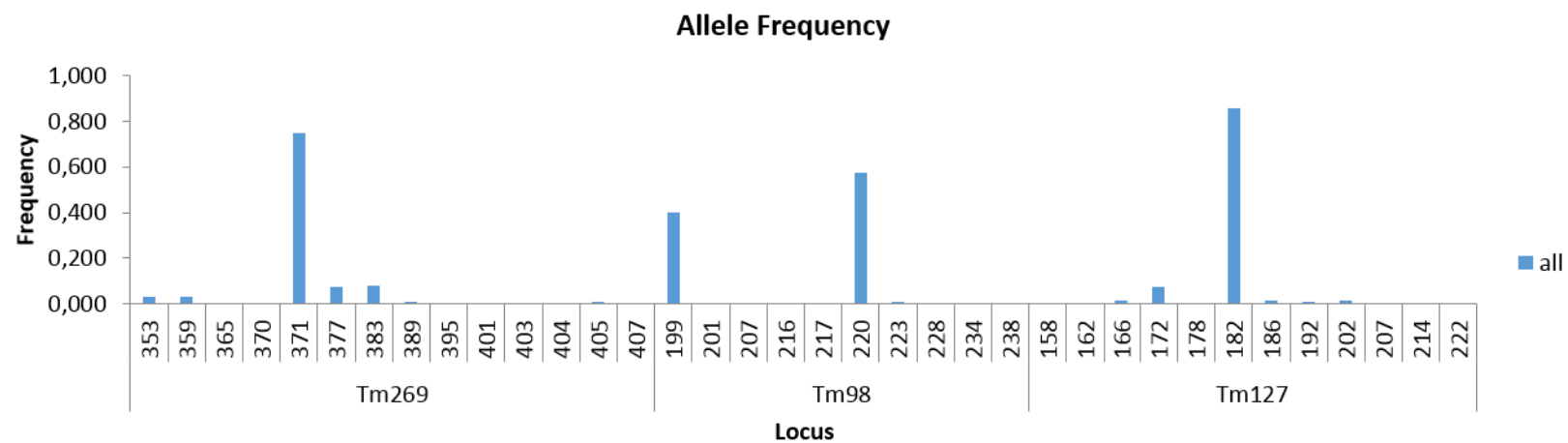
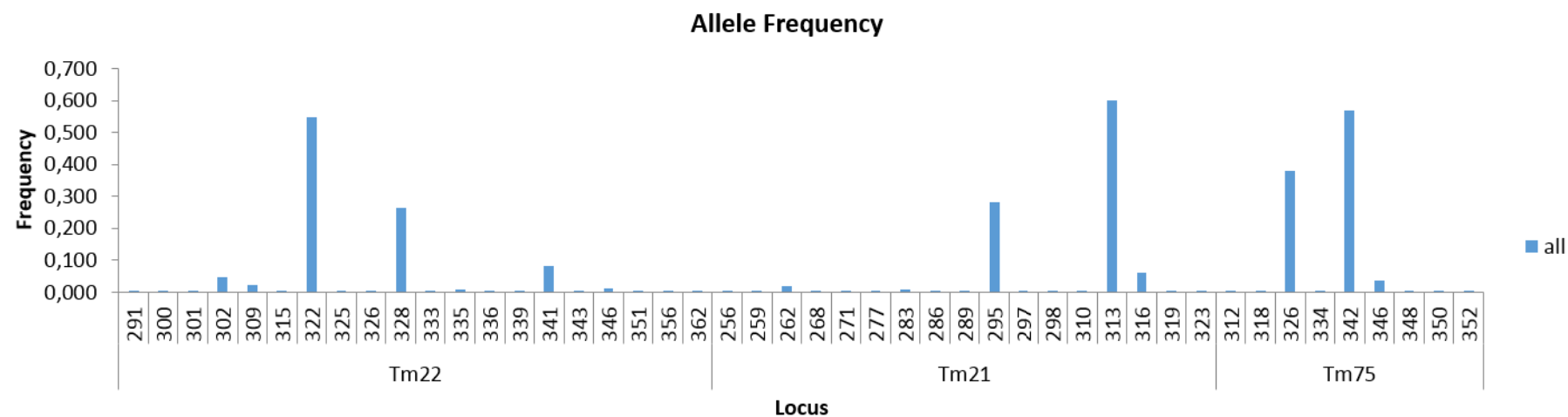
Fig. S3 – Isolation by distance analyses regressing genetic distance $F_{ST}/(1-F_{ST})$ (with common denominator) to the logarithm of spatial distance (meters) when each brûlé was considered as a population in spontaneous truffle grounds SG1 (a) and SG2 (b) and of planted truffle grounds PG1 (c) and PG2 (d).



Truffle ground	a	b	95% interval		p-value
SG1	0.578868	-0.0192512	-0.0576992	0.0310197	0.320032
SG2	0.89943	0.475899	0.23699	0.890985	0.0020002
PB1	8.00427	0.510459	0.140214	1.55432	0.0152015
PB2	0.408009	-0.171223	-0.526861	0.104445	0.169517

Figure. S4– Alleles frequencies of the 13 SSRs, calculated on all cumulated data.





Discussion & perspectives

Grâce à la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire, de physiologie végétale, d'essais en conditions contrôlées et à l'approche d'un même système avec des outils d'écologie des communautés et des populations, ce travail a permis d'apporter des éléments nouveaux concernant l'écologie et la biologie reproductive de la Truffe, basés sur un important travail de terrain qui n'aurait été possible sans la contribution de nombreux trufficulteurs. Je propose ici une lecture transversale des résultats majeurs en suivant le fil des différentes étapes de la vie des truffières dans les paysages méditerranéens, et en distinguant truffières spontanées et plantées lorsque nécessaire. Les principales perspectives de recherches qui se sont dessinées au cours de ce travail seront récapitulées, avant de finir par une conclusion plus générale.

1 Naissance, vie et mort des truffières

1.1 Naissance du brûlé

a- Apparition des premiers signes sur la flore

Visuellement, en milieu naturel ou en plantation, les premiers signes du brûlé apparaissent bien avant la production d'ascocarpes sur la strate herbacée, dominée par des espèces à endomycorhizes arbusculaires (AM). Cependant, ce symptôme visible sur la flore n'est pas systématique et semble dépendre des sites, certaines zones de production de Truffe ne montrant aucun signe visible sur la flore. Les descriptions du brûlé sont en grande partie empiriques, *de visu*, l'effet est indéniable : le sol paraît dénudé, probablement sous l'effet de la baisse de la densité et la disparition de certaines espèces de plantes (**Fig. 3**). Cependant, peu de travaux ont essayé de quantifier cet effet sur la flore, et des travaux de l'équipe du LSTM montrent que la distinction de la flore intra et hors brûlé ne semble pas liée à l'exclusion spécifique de certaines espèces (Mousain *et al.*, 2013). Les rares études réalisées sur la flore du brûlé se sont focalisées sur la description qualitative et non quantitative de la flore des brûlés (Martegoute & Courdeau, 2002 ; González-Armada *et al.*, 2010). Dans notre **Article 2**, nous montrons que les premiers symptômes de la présence de mycélium de Truffe dans le sol pourraient être provoqués par une réduction significative de la colonisation par de nouvelles germinations expliquant au moins en partie la physionomie particulière des brûlés. A partir de connaissances empiriques des trufficulteurs, d'articles de la « littérature grise » et d'observations personnelles, six espèces de plantes AM ont été choisies sur la base de leur interaction présumée avec la Truffe. Au bout de deux années de croissance dans des mésocosmes avec des chênes inoculés ou non inoculés par la Truffe, aucun signe de stress n'a pu être observé visuellement sur ces plantes, ni au niveau de leur biométrie aérienne (développement, rougissement ou jaunissement ; appréciation visuelle), ni sur leur phénologie (suivi du débourrement végétatif, floraison ; données non publiées). Néanmoins, au bout de trois ans, l'assimilation phosphatée globale de l'ensemble des plantes était significativement réduite en présence de la Truffe, les espèces supposées les plus sensibles ne semblant pas plus impactées que les autres. Ainsi, nos résultats suggèrent que les effets de la Truffe sur la végétation s'expriment surtout précocement, au moment de la germination. González-Armada *et al.* (2010) émettent par ailleurs l'hypothèse selon laquelle les plantes annuelles (thérophytes) majoritairement présentes sur les brûlés, évitent, par une germination et floraison précoce, la phase la plus active du mycélium sur le brûlé. De plus, après deux années de croissance en présence de Truffe dans les mésocosmes, la concentration en phosphore mesurée dans les feuilles des plantes AM était significativement réduite, alors que celle des jeunes plants de chêne était significativement augmentée. La Truffe a-t-elle appauvri le sol en phosphore au profit de son hôte ou a-t-elle affecté la

capacité d'absorption des plantes AM, soit 1) directement en réduisant le développement du système racinaire de ces plantes (Splivallo *et al.*, 2009), soit 2) *via* les communautés microbiennes qui leur sont associées (notamment leur symbionte endomycorhizien) ? Afin de tester ces hypothèses, les teneurs en P du sol, ainsi que les biomasses racinaires et aériennes des plantes, et le taux de mycorhization des racines des plantes AM et ECMs seront mesurés au cours du printemps 2015, et mis en relation avec les concentrations en mycélium de Truffe dans le sol.

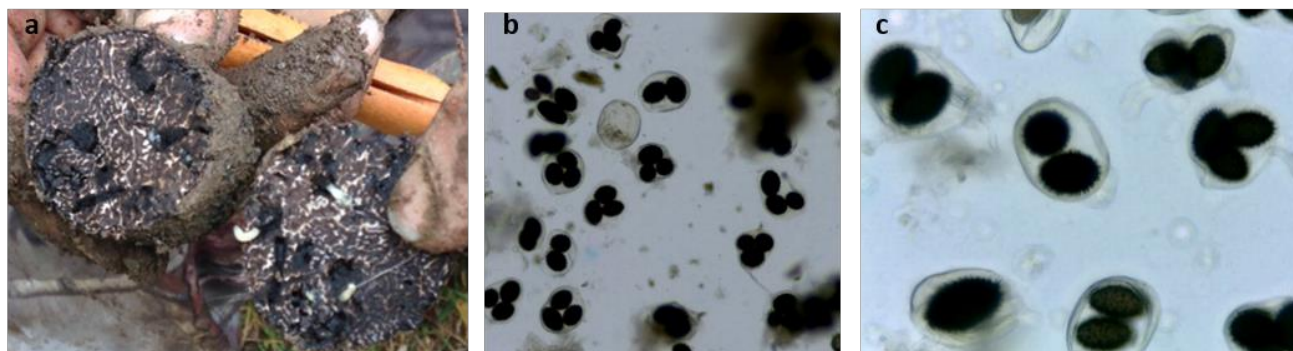
b- Origine de l'inoculum

Alors que dans les plantations, les jeunes plants sont massivement mycorhizés par la Truffe, lors de l'apparition spontanée de brûlés, la Truffe semble d'abord peu abondante sur les racines au niveau de la communauté ECM (**Article 1**). Les concentrations en mycélium dans le sol varient à ce stade initial en fonction des brûlés, avec des valeurs moyennes relativement faibles comparées à celles de certains brûlés producteurs (**Article 1** ; Parladé *et al.*, 2013). Néanmoins, ces concentrations semblent suffisantes pour provoquer sur la flore des symptômes détectables visuellement.

En plantation, l'inoculum de Truffe initial provient, au moins en partie, de l'inoculation des jeunes plants, mais l'origine et la diversité des ascocarpes utilisés est souvent peu caractérisée (ou répertoriée). Lorsque les brûlés se déclarent de façon spontanée, l'origine de l'inoculum, sans doute dispersé par zoochorie, reste également incertaine. La colonisation racinaire des plantes hôtes peut provenir de plusieurs sources, 1) de spores stockées et dormantes dans le sol, 2) de croissances végétative de mycélium de Truffe dans le sol, 3) par fragmentation du mycélium et apport extérieur. Globalement, on connaît donc peu l'origine de l'inoculum, bien qu'on l'imagine plus dense en plantation. On sait aussi que des pratiques de réensemencement sont utilisées dans les deux contextes, néanmoins, d'après nos discussions avec les trufficulteurs, cette pratique semble beaucoup moins fréquente sur les truffières spontanées.

D'où viendraient les spores présentes dans le sol ? En tant que champignon hypogé, la Truffe disperse ses spores essentiellement par endozoochorie, essentiellement par des mammifères, notamment le sanglier (Génard *et al.*, 1988) ou des petits rongeurs (Maser *et al.*, 1978), dont les fèces concentrent et distribuent de manière discontinue dans l'espace les spores issues de un ou plusieurs ascocarpe(s) consommé(s). Le degré d'apparementement entre génets dépendrait à la fois de la prise alimentaire (nombre d'ascocarpes consommés) et de la mobilité (qui peut mélanger des génets peu apparentés). Localement, des insectes mycophages contribuent à la dispersion sur des distances nettement plus petites (**Fig. 14**), et il semblerait que les spores de nombreux ascocarpes non collectés (observations personnelles) restent stockées dans le sol, la chair des Truffes se décomposant sur place. Comme chez d'autres hypogés telles que les rhizopogons, la paroi épaisse des spores de Truffe les protège et il est possible que ces spores restent longtemps dormantes dans le sol, la capacité de colonisation racinaire augmentant même avec le temps (Bruns *et al.*, 2009). Les résultats obtenus lors d'une expérience préliminaire à l'installation des mésocosmes de l'**Article 2** montrent que le sol provenant de truffières possède un fort potentiel d'inoculation.

Figure 14 a. Un ascomarque de *T. melanosporum* trouvé en fin de saison (en mars), dévoré par des larves de mouche, probablement du genre *Suillia*. Les déjections des larves ont été observées sous microscope (**b.** grossissement $\times 100$; **c.** grossissement $\times 400$) et montrent les nombreuses spores ingérées, libérées de la gléba (récolte chez J.-L. Magenti ; photos M. Sauve).



Dans cette expérience pilote, dix chênes verts inoculés et 10 chênes verts non-inoculés ont été plantés dans du sol provenant d'une truffière (séché mais sans stérilisation préalable ; aimablement cédé par P. Bernadach, Pyrénées-Orientales). Après un an, la proportion d'ectomycorhizes de Truffe sur les racines de chênes (nombre rapporté au total de racines fines ectomycorhizées) était en moyenne de 69% sur les plants inoculés contre 54% sur les plants non-inoculés (atteignant jusqu'à 83% sur l'un de ces chênes). Anciennement, l'apport de terre provenant de truffière dans des clairières de chênaies était pratiqué pour la création de nouvelles truffières comme le relate Kiefer, inspecteur adjoint des forêts à Uzès (1887). Les plants inoculés, appelés « planteurs », étaient traditionnellement produits en semant des glands dans de la terre prélevée à proximité de bonnes truffières (Olivier *et al.*, 2012). Les rares études qui se sont intéressées aux banques de spores dans le sol montrent en effet l'abondance et/ou la dominance de spores d'espèces hypogées, dont *Tuber* (Taylor & Bruns, 1999, Glassman *et al.*, 2015) et avancent l'hypothèse qu'au-delà de l'adaptation à la sécheresse, la fructification hypogée confère aux espèces concernées une meilleure persistance dans le sol et permet l'accumulation de spores au niveau des racines à coloniser (Taylor & Bruns, 1999). Il est possible que cette banque sporale, ainsi que la rapidité de germination après perturbation ou mise en présence de racines hôtes, participe au caractère pionnier de nombreuses espèces (Mason *et al.*, 1987; Newton, 1992; Nara, 2009) dont certainement la Truffe.

La création de nouveaux brûlés peut aussi provenir d'une colonisation par croissance végétative du mycélium de Truffe dans le sol provenant des plantes colonisées voisines. Il est aussi possible que la Truffe se disperse et forme de nouveaux brûlés par fragmentation du mycélium. Même si cela reste probablement relativement rare, notamment en l'absence de spores mitotiques connues, nos résultats sont compatibles avec cette hypothèse. Sur l'une des truffières spontanées étudiées dans l'**Article 3** (PG1, **Fig. S2**), quelques génotypes ont été retrouvés sur différents brûlés, à une distance supérieure à 150 m (MLG 16, 17 ou encore 32, P_{sex^1} significative ; **Table S3**).

¹ Indice statistique basé sur les fréquences alléliques de la population permettant de vérifier la probabilité que deux individus du même génotype (définis sur l'ensemble des locus étudiés) soient issus d'un seul et unique évènement de reproduction (Arnaud-Haond *et al.*, 2007).

1.2 Développement végétatif et fructification dans les brûlés producteurs

a- Une vision souterraine des brûlés producteurs : la communauté ECM

Au stade de production, l'abondance relative de la Truffe dans les communautés ECMs, mesurée par le nombre de ses ectomycorhizes, devient plus importante que dans les stades plus précoces. Nous avons ainsi pu démontrer que le passage en production du brûlé s'accompagne d'un changement de statut de la Truffe qui devient alors la seconde espèce en abondance (**Article 1**). De manière intéressante, la Truffe parvient alors à co-dominer des communautés particulièrement riches. Une telle capacité peut traduire deux fondements de l'écologie du champignon et de la truffière, de manière non exclusive, 1) l'établissement de conditions ponctuelles (biotiques et/ou abiotiques) particulièrement favorables à l'établissement de la Truffe dans ces communautés (en lien avec sa niche écologique) et 2) une capacité compétitive élevée de la Truffe vis-à-vis des autres espèces ECM, au moins transitoirement dans l'évolution des communautés. Etudions ces deux aspects successivement.

1) Lorsque le trufficulteur voit les premiers signes d'un brûlé apparaissant en truffière spontanée, il n'est pas rare qu'il « aide » le brûlé à devenir producteur, notamment en débroussaillant un peu si nécessaire, par un labour superficiel du sol par exemple, ce qui pourrait *de facto* favoriser la Truffe vis-à-vis des autres espèces ECMs présentes dans le sol. Par ailleurs, l'expérience en mésocosmes de l'**Article 2** a clairement montré que la présence de certaines espèces de plantes AM, dans notre cas l'églantier (*R. canina*), l'anthyllide vulnérable (*Anthyllis vulneraria*) et la fétuque (*Festuca ovina*), favorise le développement du mycélium de Truffe. Même si les processus impliqués restent mal compris, la présence de plantes AM favorables pourrait, parmi d'autres facteurs, participer à la création de conditions favorables à la Truffe et à sa « conquête » des communautés ECMs dans les brûlés. Les premiers résultats prometteurs de nos expériences en mésocosmes permettent d'envisager des tests en plein champ, centrés sur ces espèces de plantes candidates, afin de déterminer la transférabilité de nos résultats vers les truffières, et d'imaginer des itinéraires truffiers qui les intégreraient.

2) La compétition entre espèces ECMs est difficile à mesurer *in situ*. En effet, il faut distinguer les effets de deux moteurs majeurs de la composition et de la dynamique des assemblages, le rôle du filtre environnemental (ensemble des conditions et contraintes de milieux) et les effets de la compétition interspécifique. Une approche par traits fonctionnels a été réalisée avec succès sur d'autres organismes, en particulier les plantes, dont les processus déterminant la coexistence ou la compétition interspécifique commencent à être abordés en se basant sur l'expression des traits fonctionnels des espèces (Stubbs & Bastow, 2004 ; Kraft *et al.*, 2008 ; Violle *et al.*, 2009). Chez les champignons, ectomycorhiziens notamment, la définition de traits fonctionnels est encore loin d'être établie (Koide *et al.*, 2014), et semble pour le moment peu étudiée. La compétition pour la ressource entre espèces ECMs pourrait être exprimée via la pression d'exodigestion et/ou de prélèvement des molécules ciblées (N et P minéral ou organique, etc.), mais pourrait aussi résulter d'effet d'allélopathie (impliquant des interactions biochimiques ; Kennedy, 2010), notamment pour la Truffe, dont les composés organiques volatiles sont souvent évoqués dans ce sens (Streiblová *et al.*, 2012). Deux études de communautés ectomycorhiziennes de brûlé en milieu naturel et cultivé (Napoli *et al.*, 2010 ; Belfiori *et al.*, 2012) mettent en avant l'hypothèse d'un effet négatif de la Truffe sur la diversité ECMs, notamment de Basidiomycètes. Il paraît nécessaire d'étayer cette hypothèse, la démonstration d'une causalité requérant le contrôle du facteur testé, et, au-delà des aspects descriptifs, de cibler les mécanismes responsables. Les connaissances biologiques et méthodologiques actuelles sur la Truffe,

telles que la maîtrise du processus d'inoculation et l'existence d'outils moléculaire d'identification et de quantification du mycélium (qPCR ; Parladé *et al.*, 2013 ; Zampieri *et al.*, 2012) ouvrent la voie à des travaux d'expérimentation en conditions simplifiées auxquelles la Truffe se prête particulièrement bien (**Article 2**).

Dans les truffières étudiées dans les Pyrénées-Orientales (**Article 1**), la composition des communautés ECM ne diffère pas significativement entre brûlés producteurs (où la Truffe est abondante sur les racines) et non producteurs (où elle figure parmi de nombreuses espèces rares). Probablement, la présence de nombreuses espèces rares (en abondance) dans ces communautés génère un bruit de fond important rendant difficile la détection de différences significatives de composition. Cependant, selon les trufficulteurs, la communauté fructifiante traduirait certaines évolutions de la truffière, la fructification de certaines espèces comme certaines *Genea* (com. pers. P. Bernadach) traduisant la prochaine entrée en production d'un brûlé. En effet, plusieurs OTUs de *Genea* sont présentes dans les communautés ECMs de notre étude, et l'une d'entre elles est particulièrement abondante lors des deux premiers stades des brûlés (3^{ème} OTU en abondance relative sur les brûlés venant d'apparaître puis première OTU en abondance relative sur les producteurs, suivie par la Truffe, *T. melanosporum* ; OTUs 33, **Article 1**), pour devenir beaucoup plus rare au stade sénescence. Cette OTU a également été identifiée dans d'autres analyses de communautés ECM de truffières (Belfiori *et al.*, 2012), et de façon plus globale, le genre *Genea* semble fréquent sur les truffières, présent dans 15 études (Miguel *et al.*, 2014). Ceci révèle l'intérêt d'explorer les liens entre connaissances empiriques et fondements scientifiques, mais à ce stade, des expériences et des observations complémentaires seraient nécessaires pour qualifier le rôle annonciateur des *Genea*, ainsi que d'autres espèces qu'il serait intéressant d'identifier grâce à des méthodes de sciences sociales (comme dans l'**Article 2**). Les intuitions de terrain sont légion en trufficulture, et constituent un riche corpus à tester par la méthode expérimentale, afin de mieux appréhender les liens entre le visible et l'invisible au sein d'un écosystème complexe.

Dans notre travail, l'identification couplée hôte/symbionte s'est révélée indispensable dans un écosystème où les espèces croissent au sein de mosaïques végétales complexes. En effet, l'analyse moléculaire couplée hôte/symbionte des ectomycorhizes (**Article 1**) a mis en évidence une différence marquée entre la distribution spatiale des canopées et celle des systèmes racinaires : la composition racinaire dans le sol ne constitue pas une projection verticale de la composition des frondes arbustives et arborescentes. La conséquence pratique est que la localisation d'un prélèvement racinaire sous une essence donnée ne permet pas d'attribuer à un hôte, sans vérification, les mycorhizes récoltées sous une canopée ! Ainsi, dans les carottes de sol prélevées sous les frondaisons du chêne kermès, seules 20% des ectomycorhizes échantillonnées appartenaient à cet hôte. Ces résultats éclairent sans doute les écrits du dernier siècle qui assuraient que les genévriers cade (*Juniperus oxycedrus*), et commun (*J. communis*), ou d'autres plantes AM, étaient des hôtes de la Truffe (Chatin, 1869), car des ascocarpes étaient fréquemment retrouvés sous leurs canopées, sans doute reliées à leurs voisins ectomycorhiziens.

Plus généralement, les communautés ECMs des truffières spontanées sont caractérisées par une diversité d'espèces comparable en richesse, mais sensiblement différente en composition, à celle des forêts de chênes verts fermées. En effet, ce ne sont pas Russulaceae et Cortinariaceae, mais Pyrenomataceae, Thelephoraceae et Tuberaceae qui dominent en fréquence et en richesse. En plus de *T. melanosporum*, quatre espèces de *Tuber* ont été détectées dans ces communautés (*T. maculatum*, *T. ferrugineum*, *T. borchii*, et *Tuber sp.*), toutes échantillonnées sur au moins deux espèces de plantes hôtes parmi les 4 espèces étudiées (*Quercus ilex*, *Q. coccifera*, *Cistus albidus*, *Arbutus unedo*). Dans nos travaux,

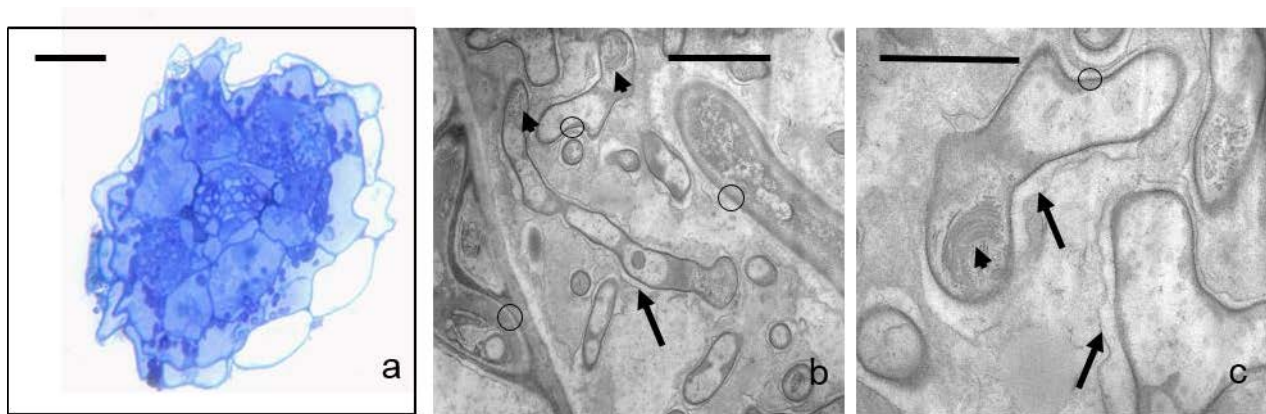
seule la Truffe a montré une préférence d'hôte significative pour le chêne vert (*Q. ilex*). Ces résultats mériteraient d'être complétés par des observations sur d'autres sites et surtout à d'autres saisons, permettant aussi un plus large échantillonnage de racines fines du chêne kermès (trop faiblement représenté dans notre échantillonnage alors qu'il est une essence hôte et productrice avérée). Pour ce chêne largement répandu en région méditerranéenne (Quézel & Médail, 2003), nos résultats constituent aussi les premiers éléments de description d'un cortège ECM jamais exploré jusqu'ici.

b- Diversité, persistance et ségrégation sexuelle des génotypes

b- 1 Présence de la Truffe sur les plantes AM

Dans le sol, le mycélium se développe de façon végétative, et, outre les ectomycorhizes formées avec des plantes hôtes de type ectomycorhizien, la présence de mycélium de Truffe a été relevée sur de nombreuses racines de plantes non-ectomycorhiziennes (46 espèces AM ; **Article 4**), sans symptôme visible. L'analyse des racines de nombreuses espèces de plantes AM en truffière a mis en évidence leur fréquente colonisation par la Truffe, ne pouvant toutefois démontrer s'il s'agit d'une colonisation externe ou interne (**Article 3**), même si la détection moléculaire persiste après stérilisation de la surface (zone corticale) des racines. De même, 9 autres espèces de champignons ECM ont pu être identifiées sur ces racines : les capacités endophytiques (colonisation diffuse sans symptôme ni mycorhize) sont fréquemment décrites pour les champignons ECM, dans les racines de plantes non-ECM, par exemple chez les Sebacinales (Selosse *et al.*, 2009 ; les espèces décrites incluent du reste *Sebacina incrustans*), des *Tricholoma* (Murata *et al.*, 2013), ou des *Hygrocybe* (Seitzman *et al.*, 2010). Nonobstant, les techniques d'amplifications PCR sont extrêmement sensibles et permettent de détecter d'infimes quantités d'ADN. Une tentative de mise en évidence par microscopie électronique a été effectuée sur plusieurs fragments de racines où de la Truffe avait été typée moléculairement, à Turin (Institute of Plant Protection – IPP, avec Paola Bonfante et Antonella Faccio, au printemps 2013 ; **Fig. 15**). Les structures fongiques observées ressemblent à celles d'autres endophytes, et la cellule végétale semble en parfait état comme en témoigne l'intégrité de la membrane. A ce stade, il est malheureusement impossible d'assurer que les structures observées appartiennent à la Truffe ou à un autre champignon. L'identification par des techniques de colorations spécifiques de type FISH (Fluorescent In Situ hybridation) ou d'immunomarquage (Plattner & Hall, 1995 ; Selosse *et al.*, 2004) et plus d'images permettant d'identifier la nature de la colonisation par la Truffe seraient nécessaires pour aller plus loin.

Figure 15. Etude de colonisation de fragments racinaires de *Geranium robertianum* de part et d'autre duquel la présence de *T. melanosporum* a été identifiée par des amorces spécifiques et par séquençage de l'ITS (voir Article 4). **a.** Observation microscopique d'une coupe transversale semi-fine colorée au bleu Cotton montrant que la racine est colonisée par un champignon (barre: 400 μ m). **b** et **c,** Observation en microscopie électronique à transmission sur coupe ultra-fine où des hyphes actifs et d'autres vides sont visibles (barre: 10 μ m) dans des cellules vivantes (voir la membrane entourant les hyphes, fléchée). Noter la paroi à deux assises (une claire et une foncée; cercles) typique d'Ascomycètes et les vésicules multiples (*multilayered bodies*, tête de flèche) qui pourraient être une ornementation de pore intercellulaire de Pézizales (Kimbrough *et al.*, 1990). Observations réalisées en 2013 avec A. Faccio & P. Bonfante à l'Institut pour la Protection des Plantes (CNR, Turin, Italie).



b- 2 Diversité génétique sur les brûlés

Les génotypes retrouvés au niveau des structures végétatives (ectomycorhizes et racines AM) correspondent majoritairement aux génotypes maternels des ascocarpes qui ont été trouvés à proximité, confirmant le lien entre les individus installés au niveau des ECMs et leur rôle dans la formation des ascocarpes (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013). Globalement, sur 36 % des brûlés (parmi les 87 brûlés analysés dans l'Article 3) plusieurs génotypes fructifiants (obtenus à partir d'ascocarpes) coexistaient sur un même brûlé, généralement de type sexuel identique. Cette ségrégation spatiale des génotypes sur la base de leur type sexuel avait déjà été observée lors de deux études précédentes (Murat *et al.*, 2013 ; Rubini *et al.*, 2011a ; Article 3) et notre analyse vient confirmer statistiquement ce patron (Article 4). Il est possible que cette ségrégation soit due au fait que les gènes impliqués dans la reconnaissance végétative entre génotypes (Glass *et al.*, 2000) soient liés aux régions non-recombinantes flanquantes (Rubini *et al.*, 2011b) des gènes des types sexuels (Article 3 ; 4). Cette sélection de parentèle, favorisant les génotypes proches génétiquement, contribuerait à la création du fort patron d'isolation par la distance observée au niveau des parcelles, indifféremment en truffières spontanées et cultivées.

b- 3 Persistance et croissance végétative

Dans les brûlés, les génotypes maternels observés au niveau des ascocarpes semblent relativement peu persistants dans le temps, avec une moyenne annuelle de 12 à 38 % des génotypes retrouvés sur

deux saisons de fructification. En général, ce sont les génotypes bien établis sur le brûlé (lorsque l'on considère leur taille et le nombre de fructifications produites par an) qui persistent d'une année sur l'autre, forment des ectomycorhizes et colonisent les plantes non - ECMs (**Article 4**). Il n'est pas à exclure que les génotypes qui ne sont pas retrouvés au niveau des fructifications persistent végétativement au niveau racinaire, dans un état de dormance du point de vue reproducteur, ce qui nécessiterait des suivis temporels plus longs et fins, mais cette méthode est destructive et ne permet qu'un seul relevé. La taille de quelques génotypes, pouvant dépasser 20 m sur les grands brûlés observables en truffières spontanées (**parcelle SG1, Fig. S2a ; Article 4**), laisse supposer une importante croissance végétative et une longévité élevée de certains individus. Par extrapolation de la vitesse d'expansion moyenne du mycélium dans le sol de 15,8 cm en moyenne par an (calculée d'après les relevés diachroniques de mycélium de Truffe dans le sol en fonction de la distance au plant ; Liu *et al.*, 2014), le génotype MLG46 de la parcelle de truffière spontanée SG1 (**Figure S4, Article 3** ; dont la valeur de P_{sex^2} est significative) aurait ainsi 63 ans ! Pour l'anecdote, M. Stengel, trufficulteur récoltant de cette truffière, signalait lors d'un entretien qu'étant enfant, il collectait déjà des truffes aux mêmes endroits, il y a environ 50 ans de cela. Cela dit, il n'est pas exclu qu'une telle taille soit atteinte par dispersion de mycélium, comme il a été suggéré pour des génotypes de champignons ECM très étendus (Selosse *et al.*, 1999). Ces données empiriques confirment donc la durabilité de l'écosystème, et non pas forcément la longévité des individus végétatifs.

c- Dispersion et appariement

Les génotypes paternels impliqués dans la formation des ascocarpes n'ont jamais été décelés, au niveau ni des ectomycorhizes, ni des racines de plantes AM sur les brûlés (**Article 3**). Et, contrairement aux génotypes maternels, les génotypes paternels ne semblent pas persister d'une année sur l'autre (les quelques persistances observées ne sont pas soutenues statistiquement par la P_{sex^2} ; **Table S3 ; Article 4**). De plus, chaque génotype paternel est impliqué dans la formation d'un seul ascocarpe, rarement plusieurs (avec une diversité clonale R moyenne de 0,78), contrairement aux génotypes maternels (dont la diversité clonale moyenne est de 0,34) pouvant sur une saison produire beaucoup d'ascocarpes, mais avec des pères différents (**Article 4**). Ceci suggère que les génotypes paternels sont de petite taille.

Où se trouvent donc ces génotypes paternels ? Le faible taux d'hétérozygotie observé sur les génotypes des zygotes (des spores) nous indique clairement une forte consanguinité entre les individus qui s'assemblent. Or, de forts patrons d'isolation par la distance sont observés à l'échelle du brûlé : ceci suggère que les gamètes de la Truffe (et plus généralement les spores) dispersent très peu (**Article 4**), compromettant fortement l'hypothèse de l'existence de spermaties impliquées dans la dispersion et la reproduction de l'espèce (Healy *et al.*, 2013 ; Tacon *et al.*, 2015). Ces observations nous confortent dans l'idée d'une importante banque de spores locales d'où émanent des pères fugaces et/ou de petite taille, peut-être même de simples germinations.

Une donnée majeure est donc le fort degré d'isolement par la distance des génotypes à l'échelle métrique (alors même que, par ailleurs, aucun isolement n'est détecté à plus large échelle). Contrairement aux spores de champignons épigés, fortement brassées dans l'air et homogénéisant

² Définition, note page [195](#)

les populations ECMs (Douhan *et al.*, 2011), la proximité génétique des génotypes de Truffe sur le brûlé peut être due, outre une possible sélection de parentèle, à la dispersion zoochore agglomérée des spores d'un ou quelques ascocarpe(s) ingéré(s) et redéposé(s) par les fèces. La dispersion groupée de spores inter-compatibles (car des deux types sexuels) issues de la même méiose peut en effet impliquer une forte consanguinité entre les individus qui s'assemblent : c'est ce qui est observé chez le champignon saprotrophe *Cyathus stercoreus*, dont les spores sont dispersées par projection de périodioles, saccules contenant de nombreuses spores issues du même individu (Malloure & James, 2013). Chez la Truffe, la création de banques de spores dans le sol peut renforcer la probabilité de consanguinité. Il serait intéressant d'évaluer 1) l'importance du nombre de truffes n'ayant pas été récoltées à la fin de la saison pour estimer l'importance de la banque de spores, 2) l'abondance et la diversité génétique des spores de Truffe dans le sol ainsi que 3) leur temps de dormance dans le sol, c'est-à-dire, le temps durant lequel elles gardent leur pouvoir germinatif dans le sol.

d- Influence des pratiques de l'homme sur la reproduction et les populations de Truffe

A première vue, la principale différence entre les truffières spontanées et plantées réside dans l'organisation spatiale des arbres et la distribution des brûlés (**Fig. 16**) : alors que dans les premières les brûlés sont disposés aléatoirement, et de tailles très variables (pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres ; truffière SG1, **Fig. S2 Article 3**) sans doute par des coalescences, les brûlés en plantations sont de tailles plus réduites autour d'arbres plantés en rangées (**Fig. 16 ; Fig. S2 de l'Article 4**).

En truffières spontanées, il est probable que l'ancienneté des brûlés et la proximité de certains arbres permettent aux brûlés de s'étendre et de fusionner, dans une matrice de plantes hôtes plus connectées. De plus, sur 47% de ces brûlés spontanés (22 sur 47 brûlés analysés au total), les ascocarpes échantillonnés présentaient deux génotypes différents au minimum, alors qu'en plantation seuls 22,5% des brûlés révélaient plus d'un génotype fructifiant. Il est possible que la compétition intra-spécifique soit initialement moins forte en truffière spontanée, du fait de la colonisation par des spores en moindre nombre, dans un environnement plus hétérogène, avec plus d'espèces ECMs déjà installées (**Article 1**). Toutefois, ramenée à la densité moyenne de génotype par mètre-carré, la densité en génotypes maternels est similaire entre brûlés plantés et spontanés.

Une différence majeure est observée au niveau des génotypes paternels : leur densité est cinq fois supérieure en plantation. Alors qu'elle équivaut à celle des génotypes maternels en truffière spontanée, elle est de 3 à 6 fois supérieure en plantation, avec des diversités génétiques 2 à 10 fois plus élevées (**Article 4**). Montrant généralement un fort déficit d'hétérozygotie, les zygotes en plantations révèlent néanmoins des valeurs de F_{IS} moins fortes (moins de consanguinité), en raison de génotypes paternels probablement moins apparentés et plus divers (**Article 4**). En plantation, le réensemencement après plantation est une pratique courante, mais ni la technique employée, ni la source, ni la fréquence des apports d'inoculum ne sont précisément connues dans les truffières étudiées (**Article 4**). Les trufficulteurs des plantations étudiées admettent avoir occasionnellement réensemencé leurs truffières « à la volée » par aspersion d'un mélange de spores et de tourbe, et avoir travaillé le sol par un labour de surface, ce qui n'est pas le cas sur les brûlés spontanés étudiés. Le réensemencement devient une pratique de plus en plus employée en trufficulture, principalement en plantation, avec des résultats contrastés sur la production (Richard & Callot *et al.*, non publié). Notamment en raison du coût élevé de cette pratique (en inoculum de Truffes), il paraît nécessaire de mieux comprendre 1) le devenir de l'inoculum ainsi dispersé, 2) sa contribution effective à la reproduction observée en plantation et 3) le rôle des perturbations occasionnées par ces pratiques

Figure 16. Image satellite (Google Earth) d'une zone choisie comme exemple en région Languedoc-Roussillon montrant (a) une parcelle de truffière plantée et ses rangées d'arbres, (b) une zone ouverte caractéristique des truffières spontanées et dont les brûlés sont visibles autour d'arbres ou de groupes d'arbres isolés, et (c) de grandes surfaces de forêts fermées, largement dominées par le chêne vert (*Q. ilex*) et dans lesquelles la Truffe ne se développe plus.



dans ces milieux, notamment sur la croissance végétative de la Truffe et/ou la germination des spores présentes dans le sol.

En effet, il faut envisager que la perturbation des sols soit le seul bénéfice au développement de la Truffe apporté par ces différents traitements, si l'on se rappelle que c'est une espèce pionnière favorisée par la perturbation. Une étude sur *T. magnatum* montre notamment que le labour augmente significativement la quantité de mycélium dans le sol (Salerni *et al.*, 2014). Ces travaux n'ont toutefois pas mis en évidence de lien avec la fructification de l'espèce, qui nécessiterait des études à plus long terme. Le temps nécessaire à la fructification (première production après 5-10 ans après plantation), associé aux multiples facteurs déterminants (séquence climatique d'une année à l'autre par exemple) rend l'évaluation de l'effet des pratiques sur la fructification complexe. Les notes prises par certains trufficulteurs et leurs observations systématiques constituent un matériau au potentiel réel pour mieux comprendre l'effet de certaines pratiques sur la production. Le dialogue avec de nombreux trufficulteurs fait apparaître de réelles volontés d'expérimentation nécessitant l'expertise scientifique (plans expérimentaux, statistique, ...) et constitue une promesse pour de futurs protocoles.

Plus globalement, aucune différence en termes de diversité génétique entre les truffières spontanées et plantées n'a été observée à l'échelle du brûlé, hormis la diversité des génotypes paternels, que ce soit à l'échelle de la parcelle (truffière) ou au niveau régional. Il est probable que les processus « naturels » de dispersion de la Truffe, par endozoochorie et par inoculation humaine, participent à l'homogénéisation des populations de Truffe, pour lesquelles aucune structuration spatiale n'a été révélée à l'échelle régionale (**Article 4**).

e- Processus de domestication

Dépourvu d'une définition consensuelle, et peu appliqué au modèle fongique, le terme domestication est défini selon des critères variables en fonction des auteurs (Zeder, 2015). La domestication peut être définie comme 1) la séparation des traits ciblés dans les populations sauvages de l'espèce, avec des changements au niveau génétique (Fuller *et al.*, 2010) et nécessitant la maîtrise par l'homme de tous les aspects de son cycle de vie (Ervynck *et al.*, 2001). D'autres définitions, basées sur le type d'interactions entre le « domestiquant » et le « domestiqué », positionnent la domestication 2) à partir de la réalisation de progrès pratiques optimisant les récoltes (Terrell *et al.*, 2003 ; Zeder, 2015), ou même 3) dans le sens d'un mutualisme réciproque, favorisant parfois davantage l'espèce domestiquée que le « domestiquant » (O'Connor, 1997). Selon la première définition énoncée ici (1), la Truffe est loin d'être domestiquée : il ne semble, pour le moment, pas y avoir de modification génétique dans le sens d'une diminution de la diversité ou d'une modification de la structure génétique globale des populations : en effet, au-delà de l'effet sur les mâles, aucune différence entre compartiment planté et sauvage n'a pu être mise en évidence à l'échelle régionale (**Article 4**). Il convient de noter que notre étude se borne à l'exemple du Languedoc-Roussillon et ses régions limitrophes (Midi-Pyrénées et Provence-Alpes-Côte-d'Azur, **Fig. 10**), et mériterait d'être étendue à d'autres régions ; de plus, l'évolution de la diversité génétique de la Truffe hors de sa zone d'origine, telle que la Nouvelle-Zélande ou l'Australie (Linde & Selmes, 2012) offre d'intéressantes perspectives. En Europe, les pratiques qui pourraient tendre vers une sélection semblent rares pour le moment ; alors que certains trufficulteurs sélectionnent de belles truffes pour le réensemencement, d'autres utilisent au contraire, pour des raisons financières évidentes, les truffes invendables (en voie de décomposition, boisées, gelées ou parasitées) ou tardives (**Article 3**). Pour le moment, il n'existe aucune étude sur le lien entre génotypes et traits phénotypiques, de résistance ou de phénologie. Il semble néanmoins que la variabilité olfactive semble, au moins en partie, liée à de la variabilité génétique chez une espèce du même genre, *T. uncinatum* (Splivallo *et al.*, 2012) : ainsi, à l'avenir, le choix des inoculums devra sans doute être optimisé. Il est à noter que de plus en plus de trufficulteurs envoient leurs propres truffes aux pépiniéristes pour la préparation de plants inoculés (com. pers. D. Berlureau, Agritruffe). La gestion et la maximisation des récoltes qui serait, d'après Zeder (2015) le précurseur essentiel de la domestication (2), définit mieux le statut actuel de la Truffe, c'est pourquoi nous parlons de proto-domestication dans l'**Article 4**. En effet, que ce soit en plantation ou en truffière spontanée, un arrosage limité en période estivale permet de contrebalancer les aléas de la sécheresse causant d'importantes fluctuations dans la survie des primordiums et, de là, dans les récoltes (Le Tacon *et al.*, 1982 ; Olivera *et al.*, 2014). Dans le cas où la domestication serait définie comme un type de mutualisme (3), le terme pourrait s'étendre à de nombreux autres organismes, dont par exemple les fourmis champignonnistes (Blatrix *et al.*, 2013). Au regard de cette définition, l'abondance de la Truffe, et plus globalement des espèces pionnières des milieux ouverts des régions méditerranéennes, est en effet fortement liée à l'homme, dans des paysages façonnés depuis longtemps par sa présence et l'utilisation qu'il en fait [**Encadré 3**]. Au regard de ces trois définitions, la Truffe est clairement un

modèle de proto-domestication, dont l'étude nécessite d'être approfondie et dont l'évolution mériterait d'être suivie dans le futur.

1.3 Sénescence des truffières

a- Une vision souterraine de la succession végétale

Les groupements végétaux à multiples hôtes ECMs au sein desquels la Truffe s'établit spontanément abritent une grande diversité fongique. Nos résultats suggèrent que les espèces à tendance généraliste (OTUs présentes sur plusieurs espèces de plantes hôtes) y dominent en abondance (**Article 1**). Ces OTUs partagées par plusieurs espèces de plantes représentent de 52 à 78% (respectivement pour *Q. ilex* et *A. unedo*) de la communauté de chaque espèce hôte étudiée, et contrairement à ce qu'ont suggéré d'autres études (Ishida *et al.*, 2007 ; Tedersoo *et al.*, 2008), la proximité phylogénétique entre les hôtes ne semble pas favoriser le partage de partenaires fongiques (**Article 1, Fig. 1**). En revanche, nos résultats sont compatibles avec l'idée suggérée par Ishida *et al.* (2007) selon laquelle les communautés ECMs les plus proches appartiennent à des hôtes occupant des positions proches dans la succession végétale. Il est probable que le partage de symbiontes joue un rôle dans le recrutement et la coexistence de ces plantes dans ces écosystèmes particulièrement dynamiques (Horton *et al.*, 1999 ; Nara, 2006 ; Richard *et al.*, 2009). Les successions secondaires en région méditerranéennes, où cistacées et éricacées précèdent classiquement les chênes (Quézel & Médail, 2003 ; **Encadré 3**), aboutissent à une végétation propice au développement de la Truffe, c'est-à-dire des peuplements dans lesquels le chêne vert domine, et de manière transitoire, sans créer de canopée continue. Ensuite, après fermeture de la canopée, les conditions changent radicalement puisqu'au stade de la futaie âgée de l'**Article 1**, les chênes ont une tendance à la mono-dominance : les arbousiers, cistes et nombreuses espèces AM potentiellement impliquées dans le développement végétatif de la Truffe (**Articles 2 et 3**) tendent alors à disparaître du sous-étage (**Fig. 16c**).

b- Les espèces du genre *Tuber*

Alors que les autres espèces de *Tuber* (*T. maculatum*, *T. ferrugineum*, *T. borchii*, et autres *Tuber*) ont été observées au niveau des communautés ECMs tout au long de la chronoséquence étudiée, la Truffe, abondante au stade de brûlé producteur, disparaît ou devient très rare après extinction de la production. Dans notre étude, la Truffe n'a en outre jamais été échantillonnée en forêt fermée, même si des traces de son mycélium y ont été relevées (**Fig. 3, Article 1**). Ces résultats suggèrent une relative fugacité de la Truffe dans les écosystèmes analysés, liée à un positionnement dans la succession plus marqué que d'autres espèces du genre *Tuber*, à la fois en termes de préférence d'hôte et d'exigences /capacités écologiques. La seconde espèce de *Tuber* abondante ici, *Tuber maculatum*, semble pour sa part être une espèce relativement ubiquiste, présente aussi dans des forêts de la Sierra Nevada d'Amérique du Nord (Izzo *et al.*, 2006), et colonisant des Pinacées (*Pseudotsuga menziesii*, *Pinus pinaster* ; Parladé *et al.*, 1996).

c- Valeurs écologique et sociale des milieux ouverts : quelle gestion appropriée ?

A l'échelle du sud de la France, les tendances depuis les années 1920-1950 montrent une nette diminution des surfaces des milieux de transition et une augmentation des surfaces de forêts fermées (**Fig. 16**). Sur une zone d'étude de 2 800 ha dans l'Hérault, située autour du Pic St Loup, au nord de Montpellier, entre 1948 et 2002, les surfaces de forêts fermées ont été multipliées par quatre, et les habitats intermédiaires ont diminué de 21% (Sirami *et al.*, 2010). Les causes majeures de cette fermeture sont la diminution de la pression pastorale, avec une diminution massive des cheptels de

brebis et de chèvres dans la région, ainsi qu'une forte baisse de la pression d'exploitation sur la ressource ligneuse en lien avec l'exode rural et industriel ainsi que l'extinction de la filière charbonnage (**Encadré 3**). La fermeture et l'homogénéisation des milieux méditerranéens s'est accompagnée de la disparition de nombreuses truffières spontanées, et avec elle, de la diminution de nombreuses espèces endémiques de ces milieux de succession et de perturbation intermédiaires (Sirami *et al.*, 2010). Outre l'enjeu de conservation, ces milieux représentent un patrimoine paysager et culturel, mais aussi pour la prévention des incendies, car l'accroissement de la biomasse (Sarris *et al.*, 2013) et de la connectivité des milieux entraîne, selon les scénarios, des risques de feux accrus pour le siècle à venir (Batllori *et al.*, 2013). La mise en place d'une dynamique locale, qui encourage la réouverture du milieu pourrait être un moyen de conservation de biodiversité, notamment en raison du principe des perturbations intermédiaires déjà évoqué. Le potentiel de restauration ou de régénération de truffières sénescents (Diette & Lauriac, 2004) a été confirmé par une étude récente qui a observé une recrudescence des récoltes de Truffe après réouverture du milieu (commandité en vue d'une production de Truffe par la commune de Valencia ; Garcia-Barreda & Reyna, 2013). Les auteurs de cette étude précisent cependant qu'une attention particulière doit être apportée aux méthodes qui permettraient de tamponner le déficit hydrique de ces zones en période estivale sèche (irrigation, ou autres pistes limitant l'évaporation).

Avant de conclure, faisons ensemble un saut dans le temps. Les premières phrases de l'ouvrage consacré à la trufficulture du Dr. Pradel, écrites il y a un siècle (Pradel, 1914), donnent la mesure du changement : « *Actuellement la marche envahissante du déboisement des montagnes est l'objet des préoccupations de tous. Chaque jour voit tomber, sous la hache du bucheron, les plus beaux arbres de nos forêts et la dévastation des bois s'étend à des régions entières... Coteaux et montagnes apparaîtront dénudés et sans défense vis-à-vis des eaux, qui, n'étant plus contenues, deviendront torrents entraînant tout sur leur passage.* » Et il avance « *la trufficulture par le reboisement, le reboisement par la trufficulture* ». Celui-ci fût grandement mis en œuvre, comme l'illustre le reboisement du mont Ventoux, réputé au début du XX^e siècle pour ses immenses truffières (Olivier *et al.*, 2012). Le leitmotiv actuel, en région Languedoc-Roussillon, pourrait être « La trufficulture par l'ouverture des milieux, l'ouverture des milieux par la trufficulture ».

2 Récapitulatif des principales perspectives de recherche

2.1 Un champignon en interaction avec des hôtes variés

La Truffe semble montrer une préférence d'hôte pour le chêne vert (*Q. ilex*) sur les sites des Pyrénées-Orientales étudiés (**Article 1**), qu'elle partage avec de nombreuses espèces ECMs. Il serait intéressant de compléter cette analyse avec d'autres saisons de l'année, notamment pour mieux connaître la communauté ectomycorhizienne du chêne kermès (*Q. coccifera*), très répandu en zone méditerranéenne, et fortement présumé comme hôte spontané de la Truffe. De plus, une relecture intégrant les connaissances empiriques des trufficulteurs sur les espèces fructifiantes pourrait permettre de relier la dynamique des brûlés à des espèces fongiques indicatrices des différents stades de vie d'un brûlé.

De plus, alors que les interactions indirectes entre plantes *via* les processus microbiens du sol commencent à être intégrées dans l'étude de la dynamique des communautés végétales, ces interactions semblent s'étendre à des plantes de type mycorhizien différent, comme l'illustre l'expérience en mésocosmes de l'**Article 2**, où la Truffe est impliquée dans la médiation d'interaction

indirecte entre son hôte ECM et des plantes AM. De plus, la Truffe semble interagir de façon plus directe avec des espèces AM.

- Parasitisme & endophytisme & causes du brûlé

La présence de la Truffe a été relevée (par marquage spécifique et séquençage de l'ITS) sur des racines de nombreuses plantes AM, mais le type de colonisation, extra ou intra racinaire (et les structures impliquées) reste inconnu. La présence d'autres espèces ECMs, qui a été relevée sur ces racines, ouvre la question d'une écologie peut-être plus complexe des champignons ECMs, et la persistance d'une capacité endophytique large. L'identification par des observations microscopiques et des techniques de coloration spécifiques de type FISH (*Fluorescent In Situ hybridation*) pour la Truffe (voire d'autres modèles) serait nécessaire pour : (1) identifier les champignons impliqués et (2) caractériser au niveau morphologique l'interaction (intra- ou extracellulaire, bio- ou nécrotrophe).

Alors que certaines plantes sont favorables au développement du mycélium de la Truffe dans le sol, il ne semble pas y avoir de flux retour direct de ces plantes vers la Truffe, en particulier en termes de nutriments C, N ou P, quoique nous soyons encore dans l'attente des résultats de biomasses aériennes et racinaires totales de ces plantes. La Truffe semble tout de même affecter la concentration en P totale des plantes AM, en appauvrissant le sol en phosphate, et/ou en affectant les communautés microbiennes des plantes actives dans l'alimentation minérale des plantes AM. En complément, il serait intéressant d'analyser l'impact de la Truffe sur la composition des communautés AM de ces plantes, ainsi que des communautés bactériennes rhizosphériques.

Les premières causes du brûlé semblent liées à l'inhibition de la germination ou du développement précoce des jeunes pousses. D'autres études de laboratoire indiquent que les composés organiques volatiles émis par la Truffe peuvent être responsables (Angelini *et al.*, 2014 ; Splivallo *et al.*, 2007), mais il serait néanmoins intéressant de poursuivre l'hypothèse d'un parasitisme direct en analysant par qPCR et microscopie la concentration en mycélium de Truffes des graines en germination dans les mésocosmes. En effet, ces graines pourraient constituer une source importante en sucres et minéraux organiques pour la Truffe, et éventuellement pour des spores de Truffes nouvellement germées servant de génotypes paternels au printemps et en début d'été (moment présumé de la fécondation).

- Les plantes AM & le cycle reproducteur de la Truffe

Des génotypes de Truffe ont pu être identifiés sur 6 plantes AM présentes sur un brûlé, dominés par un génotype ayant été observé comme génotype maternel dans les ascocarpes produits. Néanmoins, lorsque le type sexuel de ces individus a pu être identifié, il s'agissait toujours du type sexuel des génotypes maternels présents à proximité, montrant que ces génotypes suivent sans doute la même agrégation de type sexuel que sur les racines ECMs. Ayant montré la possibilité de telles analyses, une étude plus approfondie incluant plus d'échantillons de plantes permettrait de compléter l'image de la diversité génétique présentes sur les brûlés ; on pourrait également vérifier sur cet échantillonnage plus conséquent si ces plantes AM peuvent momentanément accueillir les fugaces génotypes paternels.

2.2 Un champignon Ascomycète hypogé

La plupart des études de génétique des populations de champignons ectomycorhiziens se sont intéressées aux Basidiomycètes à fructifications épigées, avec généralement de faibles patrons d'isolation par la distance (Douhan *et al.*, 2011). A l'échelle de l'hectare (la truffière), le flux de gènes de la Truffe paraît très limité, avec 1) un fort patron d'isolation par la distance des génotypes végétatifs et maternels installés sur le brûlé (dont certains persistent dans le temps) et 2) un fort déficit d'hétérozygotie au niveau des zygotes. Les génotypes paternels sont probablement peu étendus et fugaces dans le temps, rarement impliqués dans la fécondation de plusieurs ascocarpes. Plusieurs processus, non exclusifs, pourraient expliquer ces observations :

- La probable absence de spermaties (parfois appelées conidies) impliquée dans une dispersion aérienne. Il serait intéressant de comparer la structure génétique obtenue pour la Truffe, pour laquelle des spermaties potentielles n'ont jamais été observées, à celle d'espèces proches chez lesquelles ces structures sont connues (*T. borchii*, *T. oligospermum* ; Urban *et al.*, 2004)
- La dispersion par dépôt de spores d'une ou quelques Truffes dans les fèces de grands *versus* petits mammifères. Alors que l'abondance des spores de *Tuber* dans les fèces de sangliers est élevée (Génard *et al.*, 1988), peu de choses sont connues sur le nombre d'ascocarpes ainsi mélangés et déposés, alors que cela détermine l'apparement local. De plus, l'abondance, la diversité et la survie des spores dans le sol restent peu connues et il serait intéressant de mieux connaître ce potentiel réservoir d'inoculum (banque de spores), au besoin également pour d'autres espèces de *Tuber* et d'autres espèces hypogées à l'exception des Pezizales.
- Au-delà de la diversité de l'inoculum, la ségrégation des types sexuels, observée auparavant (Rubini *et al.*, 2011a ; Murat *et al.*, 2013) et confirmée statistiquement dans notre étude (**Article 4**), pourrait révéler un processus de sélection de parentèle due à des gènes impliqués dans la reconnaissance végétative, situés dans les parties flanquantes et non-recombinantes des gènes du type sexuel (**Article 3**). Cette hypothèse pourrait être testée par des approches génomiques plus approfondies.

Alors que globalement aucune modification sur la diversité génétique des compartiments spontané et cultivé n'a été observée, il semblerait que certaines pratiques, comme le réensemencement annuel par des débris de truffes et /ou le travail du sol, puissent localement augmenter la diversité génétique des génotypes paternels impliqués dans la reproduction. Il paraît central de confirmer cela sur d'autres truffières d'autres régions par ailleurs, et de mieux comprendre 1) le rôle dans la reproduction de la Truffe des spores réensemencées sur les brûlés, et 2) le rôle des perturbations occasionnées par ces pratiques dans ces milieux, notamment sur la croissance végétative de la Truffe et /ou la germination des spores présentes dans le sol.

Conclusion générale

Des sources d'inspiration réciproques

1. *Truffières spontanées et plantées*

Nous avons esquissé différents traits de vie d'une espèce, *T. melanosporum*, sur la base de la structure des communautés ECMs et des structures génétiques des populations, en travaillant dans des contextes variés, d'abord dans des truffières spontanées, pour mieux connaître les interactions de la Truffe avec les plantes et champignons dans son milieu naturel, ainsi que sa biologie reproductive, puis, comparativement, en plantation. Les truffières que nous avons appelées spontanées sont définies par l'absence d'inoculation des arbres, contrairement aux plantations. Après trois années dans diverses truffières, l'observation des multiples pratiques des trufficulteurs, il semblerait que les modèles de truffières spontanées et plantées soient plutôt à considérer comme un gradient d'anthropisation, où les deux extrêmes font office d'inspiration réciproque. Pour ne citer qu'un exemple dans chaque sens, certains trufficulteurs ramènent dans leurs plantations la flore des truffières spontanées qu'ils estiment jouer un rôle favorable (et dont certains effets ont pu être confirmés dans l'**Article 2**), et l'arrosage, tel qu'il est pratiqué dans les plantations, se reproduit souvent en truffière spontanée, permettant de contrer les aléas météorologiques. L'intensité des pratiques d'intervention (taille, irrigation, travail du sol et de la végétation herbacée, voire réensemencement) est très variable en fonction du trufficulteur.

2. *Savoirs locaux, science & trufficulture*

Depuis longtemps, des techniques efficaces sont acquises par les acteurs de terrains, telles que les premières inoculations empiriques des plantations forestières par du sol de la zone d'origine (Mikola, 1970), pareillement aux premières techniques d'ensemencement de la Truffe (Kiefer, 1887). Cependant, pour perfectionner et transposer la méthode, il est indispensable de mieux connaître les processus sous-jacents à la survie et au passage à l'état reproductif, tel que ce fut le cas pour les plants mycorhizés par certains Basidiomycètes. L'observation de terrain, d'une valeur sans égale, doit être utilisée en tant que base solide pour aiguiller la recherche, où les approches de sciences humaines et sociales permettraient la transduction. A travers le travail exposé dans cette thèse, chacun des travaux est le fruit du dialogue et de la participation des trufficulteurs : dans l'**Article 1**, les stades des brûlés étaient méticuleusement renseignés par le trufficulteur ; dans l'**Article 2** des espèces de plantes interagissant avec la Truffe ont ainsi pu être spécifiquement ciblées ; dans l'**Article 4**, tous les échantillonnages ont été effectués par les trufficulteurs sur leur truffière aux profils variés, et des dialogues ont permis de connaître le type de perturbation et de cibler des pistes de travail intéressantes sur les techniques de réensemencement. La compréhension de la biologie de la Truffe et de son écosystème peut avancer grâce au dialogue entre trufficulteurs et chercheurs, par la mise en place de programmes de recherche participative ciblant des problématiques qui feront avancer simultanément la connaissance fondamentale de l'écologie fongique et les itinéraires truffiers. Une compréhension mutuelle est pour cela nécessaire, respectant les contraintes de chacun, trufficulteurs et chercheurs, tout en gardant en mémoire que les découvertes permettent rarement de concevoir directement toute la complexité d'un système et les améliorations techniques en même temps : tout se bâtit pas à pas.

En relisant ces dernières phrases, je me rends compte à quel point j'ai été tiraillée entre mon envie de mieux comprendre des processus en écologie et biologie fondamentales d'une part et l'envie de pouvoir répondre à des questions pratiques de gestionnaire d'autre part, même si ce n'était pas le but initial de ce travail. J'espère finalement que la curiosité pourra rallier ces deux parties et que chacune d'elles pourra quelque peu se nourrir de ce travail, qui pour moi ouvre un univers entier de nouvelles questions.

∞

Bibliographie

- Agerer R. 2001.** Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* **11**: 107–114.
- Agueda B, Fernandez-Toiran L, Miguel AM, Martinez-Peña F. 2010.** Ectomycorrhizal status of a mature productive black truffle plantation. *Forest Systems*; **19**: 89-97.
- Aldea J, Martínez-Peña F, Diaz-Balteiro L. 2012.** Integration of fungal production in forest management using a multi-criteria method. *European Journal of Forest Research* **131**: 1991–2003.
- Amend A, Keeley S, Garbelotto M. 2009.** Forest age correlates with fine-scale spatial structure of Matsutake mycorrhizas. *mycological research* **113**: 541–551.
- Anderson IC, Genney DR, Alexander IJ. 2014.** Fine-scale diversity and distribution of ectomycorrhizal fungal mycelium in a Scots pine forest. *New Phytologist* **201**: 1423–1430.
- Andrews JH. 1992.** Fungal life-history strategies. *The Fungal Community: its organization and role in the ecosystem* **2**: 119–145.
- Angelini P, Tirillini B, Properzi A, Rol C, Venanzoni R. 2014.** Identification and bioactivity of the growth inhibitors in *Tuber spp.* methanolic extracts. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* **0**: 1–10.
- Antony-Babu S, Deveau A, Van Nostrand JD, Zhou J, Le Tacon F, Robin C, Frey-Klett P, Uroz S. 2014.** Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental Microbiology* **16**: 2831–2847.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA. 2007.** Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* **16**: 5115–5139.
- Aumeeruddy-Thomas Y, Assenat B. 2012.** Plantes compagnes des truffières du Gard et des Pyrénées Orientales. *Rapport du projet ANR SYSTRUF, CEFE, UMR 5175, Montpellier.*
- Aumeeruddy-Thomas Y, Therville C, Lemarchand C, Lauriac A, Richard F. 2012.** Resilience of sweet chestnut and truffle holm-oak rural forests in Languedoc-Roussillon, France: roles of social-ecological legacies, domestication, and innovations. *Ecology and Society* **17**: 12.
- Barbieri E, Ceccaroli P, Saltarelli R, Guidi C, Potenza L, Basaglia M, Fontana F, Baldan E, Casella S, Ryahi O, et al. 2010.** New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biology* **114**: 936–942.
- Barry D, Staunton S, Callot G. 1994.** Mode of the absorption of water and nutrients by ascocarps of *Tuber melanosporum* and *Tuber aestivum*: a radioactive tracer technique. *Canadian Journal of Botany* **72**: 317–322.
- Bataille F. 1922.** *Flore analytique et descriptive des tubéroïdées de l'Europe et de l'Afrique du Nord.* Declume.
- Batllori E, Parisien M-A, Krawchuk MA, Moritz MA. 2013.** Climate change-induced shifts in fire for Mediterranean ecosystems. *Global Ecology and Biogeography* **22**: 1118–1129.

- Belfiori B, Riccioni C, Tempesta S, Pasqualetti M, Paolocci F, Rubini A. 2012.** Comparison of ectomycorrhizal communities in natural and cultivated *Tuber melanosporum* truffle grounds. *FEMS Microbiology Ecology* **81**: 547–561.
- Bellanger J-M, Moreau P-A, Corriol G, Bidaud A, Chalange R, Dudova Z, Richard F. 2015.** Plunging hands into the mushroom jar: a phylogenetic framework for Lyophyllaceae (Agaricales, Basidiomycota). *Genetica* **143**: 169–194.
- Bertault G, Raymond M, Berthomieu A, Callot G, Fernandez D. 1998.** Trifling variation in truffles. *Nature* **394**: 734–734.
- Bertault G, Rousset F, Fernandez D, Berthomieu A, Hochberg ME, Callot G, Raymond M. 2001.** Population genetics and dynamics of the black truffle in a man-made truffle field. *Heredity* **86**: 451–458.
- Bever JD. 2002.** Negative feedback within a mutualism: host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **269**: 2595–2601.
- Bever JD, Westover KM, Antonovics J. 1997.** Incorporating the Soil Community into Plant Population Dynamics: The Utility of the Feedback Approach. *Journal of Ecology* **85**: 561–573.
- Billiard S, López-Villavicencio M, Devier B, Hood ME, Fairhead C, Giraud T. 2011.** Having sex, yes, but with whom? Inferences from fungi on the evolution of anisogamy and mating types. *Biological Reviews* **86**: 421–442.
- Billiard S, López-Villavicencio M, Hood ME, Giraud T. 2012.** Sex, outcrossing and mating types: unsolved questions in fungi and beyond. *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 1020–1038.
- Blatrix R, Debaud S, Salas-Lopez A, Born C, Benoit L, McKey DB, Attéké C, Djité-Lordon C. 2013.** Repeated evolution of fungal cultivar specificity in independently evolved ant-plant-fungus symbioses. *PLoS ONE* **8**: e68101.
- Bonet JA, González-Olabarria JR, Aragón JMD. 2014.** Mushroom production as an alternative for rural development in a forested mountainous area. *Journal of Mountain Science* **11**: 535–543.
- Bonito GM, Gryganskyi AP, Trappe JM, Vilgalys R. 2010.** A global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA sequences: species diversity, host associations and long-distance dispersal: global meta-analysis of *Tuber* ITS rDNA. *Molecular Ecology* **19**: 4994–5008.
- Bonito G, Smith ME, Nowak M, Healy RA, Guevara G, Cázares E, Kinoshita A, Nouhra ER, Domínguez LS, Tedersoo L, et al. 2013.** Historical biogeography and diversification of Truffles in the Tuberaceae and their newly identified southern hemisphere sister lineage (JE Stajich, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e52765.
- Bosredon de Dupont, Alexandre. 1887.** *Manuel du trufficulteur : exposé complet de la méthode pratique pour l'entretien et la création des truffières*. Impression. E. Laporte (Périgueux), Editions Lacour, Nîmes.
- Brundrett MC. 2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154**: 275–304.

- Brunner I, Frey B. 2000.** Detection and localization of aluminum and heavy metals in ectomycorrhizal Norway spruce seedlings. *Environmental Pollution* **108**: 121–128.
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL. 2002.** Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* **42**: 352–359.
- Bruns TD, Peay KG, Boynton PJ, Grubisha LC, Hynson NA, Nguyen NH, Rosenstock NP. 2009.** Inoculum potential of Rhizopogon spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytologist* **181**: 463–470.
- Büntgen U, Egli S, Schneider L, von Arx G, Rigling A, Camarero JJ, Sangüesa-Barreda G, Fischer CR, Oliach D, Bonet JA, et al. 2015.** Long-term irrigation effects on Spanish holm oak growth and its black truffle symbiont. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **202**: 148–159.
- Büntgen U, Kauserud H, Egli S. 2012.** Linking climate variability to mushroom productivity and phenology. *Frontiers in Ecology and the Environment* **10**: 14–19.
- Callot G. 1999.** *La truffe, la terre, la vie*. Paris: Editions INRA.
- Caruso T, Rillig MC, Garlaschelli D. 2012.** On the application of network theory to arbuscular mycorrhizal fungi–plant interactions: the importance of basic assumptions. *New Phytologist* **194**: 891–894.
- Ceruti A, Fontana A, Nosenzo C. 2003.** European species of the genus *Tuber*. An historical revision. *Monografie XXXVII*: 467 pp.
- Chatin A. 1869.** *La Truffe*. Editions Lacour, Nîmes.
- Comandini O, Contu M, Rinaldi AC. 2006.** An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **16**: 381–395.
- Coppin E, Debuchy R, Arnaise S, Picard M. 1997.** Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 411–428.
- Courty P-E, Pritsch K, Schlöter M, Hartmann A, Garbaye J. 2005.** Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* **167**: 309–319.
- Coutin R. 1989.** Truffes et mouches rabassières. Editions INRA *Insectes* 75:6-8.
- Dahlberg A, Jonsson L, Nylund J-E. 1997.** Species diversity and distribution of biomass above and below ground among ectomycorrhizal fungi in an old-growth Norway spruce forest in south Sweden. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1323–1335.
- Dahlberg A, Stenlid J. 1990.** Population structure and dynamics in *Suillus bovinus* as indicated by spatial distribution of fungal clones. *New Phytologist* **115**: 487–493.
- Dahlberg A, Stenlid J. 1994.** Size, distribution and biomass of genets in populations of *Suillus bovinus* (L.: Fr.) Roussel revealed by somatic incompatibility. *New Phytologist* **128**: 225–234.

- Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, Silar P. 2010.** Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. pp 501–535. ASM Press, Washington, DC.
- Debussche M, Lepart J, Dervieux A. 1999.** Mediterranean landscape changes: evidence from old postcards. *Global Ecology and Biogeography* **8**: 3–15.
- Dickie AI, Reich PB. 2005.** Ectomycorrhizal fungal communities at forest edges. *Journal of Ecology* **93**: 244–255.
- Diette S, Lauriac A. 2004.** La sylviculture truffière : Aperçus historiques, apports techniques et enjeux pour la région méditerranéenne. *Revue forestière française* **56**: 219–230.
- Douhan GW, Vincenot L, Gryta H, Selosse M-A. 2011.** Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions. *Fungal Biology* **115**: 569–597.
- Dupouey JL, Dambrine E, Laffite JD, Moares C. 2002.** Irreversible impact of past land use on forest soils and biodiversity. *Ecology* **83**: 2978–2984.
- Ervynck A, Dobney K, Hongo H, Meadow R. 2001.** Born Free ? New evidence for the status of ‘*Sus scrofa*’ at neolithic Çayönü Tepesi (Southeastern Anatolia, Turkey). *Paléorient* **27**: 47–73.
- Escafre A, Roussel F. 2006.** Rapport relatif au développement de la trufficulture française. Document du Ministre de l'agriculture et de la pêche.
- Fiore-Donno A-M, Martin F. 2001.** Populations of ectomycorrhizal *Laccaria amethystina* and *Xerocomus* spp. show contrasting colonization patterns in a mixed forest. *New Phytologist* **152**: 533–542.
- Fleming LV. 1983.** Succession of mycorrhizal fungi on birch: infection of seedlings planted around mature trees. *Plant and Soil* **71**: 263–267.
- Frank B. 2004.** On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank’s classic paper of 1885). *Mycorrhiza* **15**: 267–275.
- Frøslev TG, Jeppesen TS, Læssøe T, Kjøller R. 2007.** Molecular phylogenetics and delimitation of species in *Cortinarius* section Calochroi (Basidiomycota, Agaricales) in Europe. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 217–227.
- Fuller DQ, Allaby RG, Stevens C. 2010.** Domestication as innovation: the entanglement of techniques, technology and chance in the domestication of cereal crops. *World Archaeology* **42**: 13–28.
- Garbaye J, Fortin JA. 2013.** La symbiose mycorrhizienne : Une association entre les plantes et les champignons. Editions Quae, Versailles.
- Garcia-Barreda S, Reyna S. 2013.** Response of *Tuber melanosporum* fruiting to canopy opening in a Pinus-Quercus forest. *Ecological Engineering* **53**: 54–60.
- Gardes M, Bruns TD. 1996.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above- and below-ground views. *Canadian Journal of Botany* **74**: 1572–1583.

- Génard M, Lescourret F, Durrieu G. 1988.** Mycophagie chez le sanglier et hypothèses sur son rôle dans la dissémination des spores de champignons hypogés. *Canadian Journal of Zoology* **66**: 2324–2327.
- Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ. 2006.** Fine-scale distribution of pine ectomycorrhiza and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* **170**: 381–390.
- Gherbi H, Delaruelle C, Selosse M-A, Martin F. 1999.** High genetic diversity in a population of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystina* in a 150-year-old beech forest. *Molecular Ecology* **8**: 2003–2013.
- Girlanda M, Selosse MA, Cafasso D, Brilli F, Delfine S, Fabbian R, Ghignone S, Pinelli P, Segreto R, Loreto F, et al. 2006.** Inefficient photosynthesis in the Mediterranean orchid *Limodorum abortivum* is mirrored by specific association to ectomycorrhizal Russulaceae. *Molecular Ecology* **15**: 491–504.
- Glass NL, Fleissner A. 2006.** Re-wiring the network: understanding the mechanism and function of anastomosis in filamentous Ascomycete Fungi. In: Kües PDU, Fischer PDR, eds. *The Mycota. Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer Berlin Heidelberg, 123–139.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. 2000.** The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous Ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* **34**: 165–186.
- Glassman SI, Peay KG, Talbot JM, Smith DP, Chung JA, Taylor JW, Vilgalys R, Bruns TD. 2015.** A continental view of pine-associated ectomycorrhizal fungal spore banks: a quiescent functional guild with a strong biogeographic pattern. *New Phytologist* **205**: 1619–1631.
- González-Armada B, Miguel AM, Cervero RY. 2010.** Ectomycorrhizae and vascular plants growing in brûlés as indicators of below and above ground microecology of black truffle production areas in Navarra (Northern Spain). *Biodiversity and Conservation* **19**: 3861–3891.
- Grime JP. 1977.** Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American naturalist*: 1169–1194.
- Grove AT, Rackham O. 2003.** *The Nature of Mediterranean Europe: An Ecological History*. Yale University Press.
- Gryndler M, Černá L, Bukovská P, Hřelová H, Jansa J. 2014.** *Tuber aestivum* association with non-host roots. *Mycorrhiza* **24**: 603–610.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Butler RC, Willows A, Hesom-Williams N, Li S, Wang Y. 2014.** *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza* **24**: 511–523.
- Guevara G, Bonito G, Trappe JM, Cázares E, Williams G, Healy RA, Schadt C, Vilgalys R. 2013.** New North American truffles (*Tuber spp.*) and their ectomycorrhizal associations. *Mycologia* **105**: 194–209.
- Guidot A, Debaud J-C, Effosse A, Marmeisse R. 2004.** Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist* **161**: 539–547.

- Guidot A, Johannesson H, Dahlberg A, Stenlid J. 2003.** Parental tracking in the postfire wood decay ascomycete *Daldinia loculata* using highly variable nuclear gene loci. *Molecular Ecology* **12**: 1717–1730.
- Hall IR, Yun W, Amicucci A. 2003.** Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* **21**: 433–438.
- Hall IR, Zambonelli A. 2012.** Laying the Foundations. In: Zambonelli A, Bonito GM, eds. *Soil Biology. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Springer Berlin Heidelberg, 3–16.
- Healy RA, Smith ME, Bonito GM, Pfister DH, Ge Z-W, Guevara GG, Williams G, Stafford K, Kumar L, Lee T, et al. 2013.** High diversity and widespread occurrence of mitotic spore mats in ectomycorrhizal Pezizales. *Molecular Ecology* **22**: 1717–1732.
- Van Der Heijden MGA, Horton TR. 2009.** Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* **97**: 1139–1150.
- Van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998.** Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* **396**: 69–72.
- Van der Heijden MGA, Martin FM, Selosse M-A, Sanders IR. 2015.** Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* **205**: 1406–1423.
- Henry JP, Gouyon PH. 1999.** *Précis de génétique des populations: cours, exercices et problèmes résolus*. Dunod, Paris.
- Hibbett DS, Taylor JW. 2013.** Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology* **11**: 129–133.
- Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM. 2001.** Mycorrhizal *vs* saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* **150**: 601–610.
- Hochberg ME, Bertault G, Poitrineau K, Janssen A. 2003.** Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **109**: 147–153.
- Hoeksema JD, Chaudhary VB, Gehring CA, Johnson NC, Karst J, Koide RT, Pringle A, Zabinski C, Bever JD, Moore JC, et al. 2010.** A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology letters* **13**: 394–407.
- Horton TR, Bruns TD, Parker VT. 1999.** Ectomycorrhizal fungi associated with *Arctostaphylos* contribute to *Pseudotsuga menziesii* establishment. *Canadian Journal of Botany* **77**: 93–102.
- Hubbell SP. 2001.** *The Unified Neutral Theory of Biodiversity and Biogeography* (MPB-32). Princeton University Press.
- Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB. 2009.** Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytologist* **182**: 795–798.

Ingold CT. 1971. *Fungal spores. Their liberation and dispersal.* Oxford.

Iotti M, Rubini A, Tisserant E, Kholer A, Paolocci F, Zambonelli A. 2012. Self/nonself recognition in *Tuber melanosporum* is not mediated by a heterokaryon incompatibility system. *Fungal Biology* **116**: 261–275.

Ishida TA, Nara K, Hogetsu T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytologist* **174**: 430–440.

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

Izzo A, Nguyen DT, Bruns TD. 2006. Spatial structure and richness of ectomycorrhizal fungi colonizing bioassay seedlings from resistant propagules in a Sierra Nevada forest: comparisons using two hosts that exhibit different seedling establishment patterns. *Mycologia* **98**: 374–383.

Jaillard B, Barry-Etienne D, Colinas C, De Miguel A-M, Genola L, Libre A, Neveu P, Oliach D, Saenz W, Sáez M, *et al.* 2014. Alkalinity and structure of soils determine the truffle production in the Pyrenean Regions. *Forest Systems* **23**: 364.

Jarne P, Lagoda PJJ. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 424–429.

Jeandroz S, Murat C, Wang Y, Bonfante P, Tacon FL. 2008. Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the ‘true truffles’. *Journal of Biogeography* **35**: 815–829.

Johnson NC, Graham J-H, Smith FA. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum*. *New Phytologist* **135**: 575–585.

Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes – are they mycorrhizal? *Mycorrhiza* **11**: 207–211.

Jumpponen A, Jones KL, David Mattox J, Yaege C. 2010. Massively parallel 454-sequencing of fungal communities in *Quercus* spp. ectomycorrhizas indicates seasonal dynamics in urban and rural sites. *Molecular Ecology* **19**: 41–53.

Kennedy P. 2010. Ectomycorrhizal fungi and interspecific competition: species interactions, community structure, coexistence mechanisms, and future research directions. *New Phytologist* **187**: 895–910.

Kennedy PG, Bruns TD. 2005. Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytologist* **166**: 631–638.

Kennedy PG, Peay KG, Bruns TD. 2009. Root tip competition among ectomycorrhizal fungi: Are priority effects a rule or an exception? *Ecology* **90**: 2098–2107.

Khan AG, Kuek C, Chaudhry TM, Khoo CS, Hayes WJ. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* **41**: 197–207.

- Kiefer C. 1887.** La méthode Kiefer pour la culture de la Truffe. *Journal d'Uzès*.
- Kim H, Borkovich KA. 2006.** Pheromones are essential for male fertility and sufficient to direct chemotropic polarized growth of trichogynes during mating in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* **5**: 544–554.
- Kimbrough JW, Wu C-G, Gibson JL. 1990.** Ultrastructural observations on Helvellaceae (Pezizales, Ascomycetes). IV. Ascospore ontogeny in selected species of *Gyromitra* subgenus *Discina*. *Canadian Journal of Botany* **68**: 317–328.
- Kinoshita A, Sasaki H, Nara K. 2011.** Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. *Mycologia*: 10–138.
- Kivlin SN, Winston GC, Goulden ML, Treseder KK. 2014.** Environmental filtering affects soil fungal community composition more than dispersal limitation at regional scales. *Fungal Ecology* **12**: 14–25.
- Koide RT, Fernandez C, Malcolm G. 2014.** Determining place and process: functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function. *New Phytologist* **201**: 433–439.
- Koide RT, Fernandez C, Petprakob K. 2011.** General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* **68**: 45–55.
- Kraft NJB, Valencia R, Ackerly DD. 2008.** Functional traits and niche-based tree community assembly in an Amazonian forest. *Science* **322**: 580–582.
- Kranabetter JM, Friesen J. 2002.** Ectomycorrhizal community structure on western hemlock (*Tsuga heterophylla*) seedlings transplanted from forests into openings. *Canadian Journal of Botany* **80**: 861–868.
- Kronstad JW, Staben C. 1997.** Mating Type in Filamentous Fungi. *Annual Review of Genetics* **31**: 245–276.
- Kropp BR, Langlois C-G. 1990.** Ectomycorrhizae in reforestation. *Canadian Journal of Forest Research* **20**: 438–451.
- Kües U, Liu Y. 2000.** Fruiting body production in basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**: 141–152.
- Kulifaj M. 1984.** *Tuber melanosporum* Vitt.: contribution à l'étude de la morphogenèse et de la physiologie de l'ascocarpe. Manuscrit de thèse. Université Paul Sabatier.
- Lancellotti E, Iotti M, Zambonelli A, Franceschini A. 2014.** Characterization of *Tuber borchii* and *Arbutus unedo* mycorrhizas. *Mycorrhiza*.
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N. 2001.** Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 248–254.
- Last FT, Dighton J, Mason PA. 1987.** Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends in Ecology & Evolution* **2**: 157–161.

- Lehtonen J, Jennions MD, Kokko H. 2012.** The many costs of sex. *Trends in ecology & evolution* **27**: 172–178.
- Leibold MA, McPeck MA. 2006.** Coexistence of the niche and neutral perspectives in community ecology. *Ecology* **87**: 1399–1410.
- Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR, Taylor D, Grogan P. 2004.** Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 319–332.
- Linde CC, Selmes H. 2012.** Genetic Diversity and Mating Type Distribution of *Tuber melanosporum* and Their Significance to Truffle Cultivation in Artificially Planted Truffières in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6534–6539.
- Liu B, Fischer C, Bonet JA, Olivera A, Inchusta A, Colinas C. 2014.** Pattern of *Tuber melanosporum* extramatrical mycelium expansion over a 20-year chronosequence in *Quercus ilex*-truffle orchards. *Mycorrhiza* **24**: 47–54.
- MacArthur RH, Wilson EO. 1967.** *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press.
- Maherali H, Klironomos JN. 2007.** Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. *Science* **316**: 1746–1748.
- Malloure BD, James TY. 2013.** Inbreeding depression in urban environments of the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus* (Nidulariaceae: Basidiomycota). *Heredity* **110**: 355–362.
- Mamoun M, Oliver JM. 1997.** Mycorrhizal inoculation of cloned hazels by *Tuber melanosporum*: effect of soil disinfestation and co-culture with *Festuca ovina*. *Plant and Soil* **188**: 221–226.
- Mamoun M, Olivier JM. 1991.** The effect of carbon source and form of mineral nitrogen on the development of *Tuber melanosporum* (Vitt) in pure culture. Application to production of mycelium biomass. *Agronomie* **11**: 521–527.
- Martegoute J-C, Courdeau A. 2002.** *Plantes des Causses et des truffières*. Périgueux (4 et 6 Pl. Francheville, 24016): Fédération départementale des trufficulteurs du Périgord.
- Martin F, Bonito G. 2012.** Ten years of genomics for ectomycorrhizal fungi: what have we achieved and where are we heading? In: Zambonelli A, Bonito GM, eds. *Soil Biology. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Springer Berlin Heidelberg, 383–401.
- Martínez-Peña F, de-Miguel S, Pukkala T, Bonet JA, Ortega-Martínez P, Aldea J, Martínez de Aragón J. 2012.** Yield models for ectomycorrhizal mushrooms in *Pinus sylvestris* forests with special focus on *Boletus edulis* and *Lactarius group deliciosus*. *Forest Ecology and Management* **282**: 63–69.
- Martin F, Kohler A, Murat C, Balestrini R, Coutinho PM, Jaillon O, Montanini B, Morin E, Noel B, Percudani R, et al. 2010.** Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* **464**: 1033–1038.
- Marx DH, Ruehle JL, Kenney DS, Cordell CE, Riffle JW, Molina RJ, Pawuk WH, Navratil S, Tinus RW, Goodwin OC. 1982.** Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation

techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *Forest Science* **28**: 373–400.

Maser C, Trappe JM, Nussbaum RA. 1978. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis on Oregon coniferous forests. *Ecology* **59**: 799–809.

Mason PA, Last FT, Wilson J. 1987. *Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi*. Cambridge University Press.

Mayden RL. 1997. A Hierarchy of Species Concepts: The Denouement in the Saga of the Species Problem. In: Claridge MF, Dawah HA, Wilson MR, eds. *Species: The units of diversity*. Chapman and Hall, 381–423.

Mcgill B, Enquist B, Weiher E, Westoby M. 2006. Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 178–185.

McGuire KL. 2007. Common ectomycorrhizal networks may maintain monodominance in a tropical rain forest. *Ecology* **88**: 567–574.

McIntire EJB, Fajardo A. 2014. Facilitation as a ubiquitous driver of biodiversity. *New Phytologist* **201**: 403–416.

Mendel G. 1865. Experiments in plant hybridization (1865). *Verhandlungen des naturforschenden Vereins Brünn.*) Available online: www.mendelweb.org/Mendel.html (accessed on 1 January 2013).

Miguel AM, Águeda B, Sánchez S, Parladé J. 2014. Ectomycorrhizal fungus diversity and community structure with natural and cultivated truffle hosts: applying lessons learned to future truffle culture. *Mycorrhiza* **24**: 5–18.

Mikola P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. *International review of forestry research*, **3**, 123–196.

Mousain D, Coste JM, Galiana A, Ducousso M, Le Roux C, Domergue O, Duponnois R, Bourillon J, Baudoin E, Pontiroli A, et al. 2013. La flore des sites truffiers: les apports du projet SYSTRUF. *Le trufficulteur* **82**: 14–16.

Murata H, Yamada A, Maruyama T, Endo N, Yamamoto K, Ohira T, Shimokawa T. 2013. Root endophyte interaction between ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake* and arbuscular mycorrhizal tree *Cedrela odorata*, allowing in vitro synthesis of rhizospheric ‘shiro’. *Mycorrhiza* **23**: 235–242.

Murat C. 2014. Forty years of inoculating seedlings with truffle fungi: past and future perspectives. *Mycorrhiza*: 1–5.

Murat C, Díez J, Luis P, Delaruelle C, Dupré C, Chevalier G, Bonfante P, Martin F. 2004. Polymorphism at the ribosomal DNA ITS and its relation to postglacial re-colonization routes of the Perigord truffle *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* **164**: 401–411.

- Murat C, Rubini A, Riccioni C, De la Varga H, Akroume E, Belfiori B, Guaragno M, Le Tacon F, Robin C, Halkett F, et al. 2013.** Fine-scale spatial genetic structure of the black truffle (*Tuber melanosporum*) investigated with neutral microsatellites and functional mating type genes. *New Phytologist* **199**: 176–187.
- Napoli C, Mello A, Borra A, Vizzini A, Sourzat P, Bonfante P. 2010.** *Tuber melanosporum*, when dominant, affects fungal dynamics in truffle grounds. *New Phytologist* **185**: 237–247.
- Nara K. 2006.** Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist* **169**: 169–178.
- Nara K. 2009.** Spores of ectomycorrhizal fungi: ecological strategies for germination and dormancy. *New Phytologist* **181**: 245–248.
- Newton AC. 1992.** Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **2**: 75–79.
- Nguyen NH, Hynson NA, Bruns TD. 2012.** Stayin' alive: survival of mycorrhizal fungal propagules from 6-yr-old forest soil. *Fungal Ecology* **5**: 741–746.
- O'Connor TP. 1997.** Working at relationships: another look at animal domestication. *Antiquity* **71**: 149–156.
- Oei P. 2003.** Mushroom cultivation: appropriate technology for mushroom growers. : xii + 429 pp.
- Olivera A, Bonet JA, Oliach D, Colinas C. 2014.** Time and dose of irrigation impact *Tuber melanosporum* ectomycorrhiza proliferation and growth of *Quercus ilex* seedling hosts in young black truffle orchards. *Mycorrhiza* **24**: 73–78.
- Olivier J-M, Savignac J-C, Sourzat P. 2012.** *Truffe et trufficulture*. Périgueux: Editions Fanlac.
- Otsing E, Tedersoo L. 2014.** Temporal dynamics of ectomycorrhizal fungi and persistence of *Tuber melanosporum* in inoculated *Quercus robur* seedlings in North Europe. *Mycorrhiza* **25**: 61–66.
- Otto SP. 2009.** The Evolutionary Enigma of Sex. *The American Naturalist* **174**: S1–S14.
- Pacioni G. 1991.** Effects of *Tuber* metabolites on the rhizospheric environment. *Mycological Research* **95**: 1355–1358.
- Pacioni G, Leonardi M, Carlo PD, Ranalli D, Zinni A, Laurentiis GD. 2014.** Instrumental monitoring of the birth and development of truffles in a *Tuber melanosporum* orchard. *Mycorrhiza* **24**: 65–72.
- Paolocci F, Rubini A, Riccioni C, Arcioni S. 2006.** Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2390–2393.
- Parladé J, Pera J, Alvarez IF. 1996.** Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **6**: 237–245.
- Parladé J, Varga H, Miguel AM, Sáez R, Pera J. 2013.** Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. *Mycorrhiza* **23**: 99–106.

- Peter M, Ayer F, Egli S. 2001.** Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* **149**: 311–325.
- Piattoni F, Amicucci A, Iotti M, Ori F, Stocchi V, Zambonelli A. 2014.** Viability and morphology of *Tuber aestivum* spores after passage through the gut of *Sus scrofa*. *Fungal Ecology* **9**: 52–60.
- Pickles BJ, Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ. 2012.** Spatial analysis of ectomycorrhizal fungi reveals that root tip communities are structured by competitive interactions. *Molecular Ecology* **21**: 5110–5123.
- Plattner I, Hall IR. 1995.** Parasitism of non-host plants by the mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Mycological Research* **99**: 1367–1370.
- Plett JM, Martin F. 2011.** Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics* **27**: 14–22.
- Poitou N, Mamoun M, Ducamp M, Delmas J. 1984.** Apres le bolet granuleux, le lactaire délicieux obtenu en fructification au champ a partir de plants mycorhizes [*Lactarius deliciosus*]. *PHM Revue Horticole*.
- Pozo MJ, Jung SC, López-Ráez JA, Azcón-Aguilar C. 2010.** Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. In: Koltai H, Kapulnik Y, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Springer Netherlands, 193–207.
- Pradel L. 1914.** *Manuel de trufficulture*. Edition Lacour, Nîmes.
- Pringle A, Bever JD, Gardes M, Parrent JL, Rillig MC, Klironomos JN. 2009.** Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**: 699–715.
- Van der Putten WH, Bardgett RD, Bever JD, Bezemer TM, Casper BB, Fukami T, Kardol P, Klironomos JN, Kulmatiski A, Schweitzer JA, et al. 2013.** Plant–soil feedbacks: the past, the present and future challenges. *Journal of Ecology* **101**: 265–276.
- Quézel P, Médail F. 2003.** *Ecologie et biogéographie des forêts du bassin méditerranéen*. Vol. 572. Paris: Elsevier.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2000.** *Biologie végétale*. De Boeck Supérieur.
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H. 1994.** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 11841–11843.
- Renaux A, Métailié G, Thompson J. 2011.** *Le savoir en herbe: autrefois, la plante et l'enfant*. Nouvelles presses du Languedoc.
- Richard F, Bellanger J-M, Clowez P, Courtecuisse R, Hansen K, O'Donnell K, Sauve M, Urban A, Moreau P-A. 2014.** True morels (*Morchella*, Pezizales) of Europe and North America: evolutionary relationships inferred from multilocus data and a unified taxonomy. *Mycologia*: 14–166.

- Richard F, Millot S, Gardes M, Selosse M-A. 2005.** Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* **166**: 1011–1023.
- Richard F, Selosse M-A, Gardes M. 2009.** Facilitated establishment of *Quercus ilex* in shrub-dominated communities within a Mediterranean ecosystem: do mycorrhizal partners matter?: Do mycorrhizal fungi drive establishment of *Quercus ilex*? *FEMS Microbiology Ecology* **68**: 14–24.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. 2008.** Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*.
- Rineau F, Roth D, Shah F, Smits M, Johansson T, Canbäck B, Olsen PB, Persson P, Grell MN, Lindquist E, et al. 2012.** The ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* converts organic matter in plant litter using a trimmed brown-rot mechanism involving Fenton chemistry. *Environmental Microbiology* **14**: 1477–1487.
- Riousset L, Riousset G, Chevalier G, Bardet M-C. 2001.** *Truffes d'Europe et de Chine*. Editions Quae.
- Robinson D, Fitter A. 1999.** The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. *Journal of Experimental Botany* **50**: 9–13.
- Rousset F. 1997.** Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**: 1219–1228.
- Rousset. 2000.** Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 58–62.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011a.** *Tuber melanosporum*: mating type distribution in a natural plantation and dynamics of strains of different mating types on the roots of nursery-inoculated host plants. *New Phytologist* **189**: 723–735.
- Rubini A, Belfiori B, Riccioni C, Tisserant E, Arcioni S, Martin F, Paolocci F. 2011b.** Isolation and characterization of MAT genes in the symbiotic ascomycete *Tuber melanosporum*. *New Phytologist* **189**: 710–722.
- Rubini A, Riccioni C, Belfiori B, Paolocci F. 2014.** Impact of the competition between mating types on the cultivation of *Tuber melanosporum*: Romeo and Juliet and the matter of space and time. *Mycorrhiza* **24**: 19–27.
- Salerni E, Iotti M, Leonardi P, Gardin L, D'Aguanno M, Perini C, Pacioni P, Zambonelli A. 2014.** Effects of soil tillage on *Tuber magnatum* development in natural truffières. *Mycorrhiza* **24**: 79–87.
- Sarris D, Christopoulou A, Angelonidi E, Koutsias N, Fulé PZ, Arianoutsou M. 2013.** Increasing extremes of heat and drought associated with recent severe wildfires in southern Greece. *Regional Environmental Change* **14**: 1257–1268.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Consortium FB, List FBCA, Bolchacova E, et al. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 6241–6246.

- Seitzman BH, Ouimette A, Mixon RL, Hobbie EA, Hibbett DS. 2010.** Conservation of biotrophy in Hygrophoraceae inferred from combined stable isotope and phylogenetic analyses. *Mycologia*.
- Selosse M-A, Dubois M-P, Alvarez N. 2009.** Do Sebaciniales commonly associate with plant roots as endophytes? *Mycological Research* **113**: 1062–1069.
- Selosse M-A, Faccio A, Scappaticci G, Bonfante P. 2004.** Chlorophyllous and Achlorophyllous Specimens of *Epipactis microphylla* (Neottieae, Orchidaceae) Are Associated with Ectomycorrhizal Septomycetes, including Truffles. *Microbial Ecology* **47**: 416–426.
- Selosse M-A, Jacquot D, Bouchard D, Martin F, Le Tacon F. 1998.** Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Molecular Ecology* **7**: 561–573.
- Selosse MA, Martin F, Le Tacon F. 1999.** Structure and dynamic of artificially introduced and naturally occurring *Laccaria spp* genets in a European Douglas-fir plantation. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2006–2014.
- Selosse M-A, Richard F, He X, Simard SW. 2006.** Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 621–628.
- Selosse M-A, Roy M. 2009.** Green plants that feed on fungi: facts and questions about mixotrophy. *Trends in Plant Science* **14**: 64–70.
- Simard SW, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R. 1997.** Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* **388**: 579–582.
- Sirami C, Nespoulous A, Cheylan J-P, Marty P, Hvenegaard GT, Geniez P, Schatz B, Martin J-L. 2010.** Long-term anthropogenic and ecological dynamics of a Mediterranean landscape: Impacts on multiple taxa. *Landscape and Urban Planning* **96**: 214–223.
- Slepecky RA, Starmer WT. 2009.** Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* **101**: 823–832.
- Smith MJ. 1971.** What use is sex? *Journal of Theoretical Biology* **30**: 319–335.
- Smith SE, Read DJ. 2008.** *Mycorrhizal Symbiosis, Third Edition*. Amsterdam; Boston: Academic Press.
- Splivallo R, Fischer U, Gobel C, Feussner I, Karlovsky P. 2009.** Truffles regulate plant root morphogenesis via the production of auxin and ethylene. *Plant Physiology* **150**: 2018–2029.
- Splivallo R, Novero M, Berteau CM, Bossi S, Bonfante P. 2007.** Truffle volatiles inhibit growth and induce an oxidative burst in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **175**: 417–424.
- Splivallo R, Ottonello S, Mello A, Karlovsky P. 2011.** Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist* **189**: 688–699.

- Splivallo R, Valdez N, Kirchhoff N, Ona MC, Schmidt J-P, Feussner I, Karlovsky P. 2012.** Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist* **194**: 823–835.
- Streiblová E, Gryndlerová H, Gryndler M. 2012.** Truffle brûlé: an efficient fungal life strategy. *FEMS Microbiology Ecology* **80**: 1–8.
- Stubbs WJ, Bastow WJ. 2004.** Evidence for limiting similarity in a sand dune community. *Journal of Ecology* **92**: 557–567.
- Suz LM, Martín MP, Oliach D, Fischer CR, Colinas C. 2008.** Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum*–*Quercus ilex* orchards. *FEMS Microbiology Letters* **285**: 72–78.
- Le Tacon F, Delmas J, Gleyze R, Bouchard D. 1982.** Influence du regime hydrique du sol et de la fertilisation sur la fructification de la truffe noire du Perigord (*Tuber melanosporum* Vitt.) dans le Sud-Est de la France [Vaucluse; irrigation, paillage]. *Acta Oecologia Oecologia Applicata*.
- Le Tacon F, Mousain D, Garbaye J, Bouchard D, Churin J-L, Argillier C, Amirault J-M, Genere B. 1997.** Mycorrhizes, pépinières et plantations forestières en France. *Revue forestière française*.
- Le Tacon F, Zeller B, Plain C, Hossann C, Bréchet C, Robin C. 2013.** Carbon transfer from the host to *Tuber melanosporum* mycorrhizas and ascocarps followed using a ¹³C pulse-labeling technique. *PLoS ONE* **8**: e64626.
- Le Tacon FL, Marçais B, Courvoisier M, Murat C, Montpied P, Becker M. 2014.** Climatic variations explain annual fluctuations in French Périgord black truffle wholesale markets but do not explain the decrease in black truffle production over the last 48 years. *Mycorrhiza* **24**: 115–125.
- Le Tacon FL, Rubini A, Murat C, Riccioni C, Robin C, Belfiori B, Zeller B, Varga HD la, Akroume E, Deveau A, et al. 2015.** Certainties and uncertainties about the life cycle of the Périgord black truffle (*Tuber melanosporum* Vittad.). *Annals of Forest Science*: 1–13.
- Le Tacon FL, Selosse M-A. 1994.** La place des symbioses mycorrhiziennes dans l'évolution et la colonisation des continents par la vie. *Acta Botanica Gallica* **141**: 405–419.
- Talou T, Gaset A, Delmas M, Kulifaj M, Montant C. 1990.** Dimethyl sulphide: the secret for black truffle hunting by animals? *Mycological Research* **94**: 277–278.
- Taylor DL, Bruns TD. 1999.** Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: minimal overlap between the mature forest and resistant propagule communities. *Molecular Ecology* **8**: 1837–1850.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000.** Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21–32.
- Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjoller R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, et al. 2012.** Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* **21**: 4160–4170.

- Tedersoo L, Jairus T, Horton BM, Abarenkov K, Suvi T, Saar I, Kõljalg U. 2008.** Strong host preference of ectomycorrhizal fungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNA barcoding and taxon-specific primers. *New Phytologist* **180**: 479–490.
- Tedersoo L, Smith ME. 2013.** Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* **27**: 83–99.
- Terrell JE, Hart JP, Barut S, Cellinese N, Curet A, Denham T, Kusimba CM, Latinis K, Oka R, Palka J, et al. 2003.** Domesticated Landscapes: The Subsistence Ecology of Plant and Animal Domestication. *Journal of Archaeological Method and Theory* **10**: 323–368.
- Tokeshi M. 1993.** Species Abundance Patterns and Community Structure. In: Fitter MB and AH, ed. *Advances in Ecological Research*. Academic Press, 111–186.
- Tourrette J-F. 2014.** *Etude de la filière trufficole en Provence*. Chambre régionale d'agriculture de Provence-Alpes-Côte d'Azur ; Fédération régionale des trufficulteurs de Provence-Alpes-Côte d'Azur.
- Urban A, Neuner-Plattner I, Krisai-Greilhuber I, Haselwandter K. 2004.** Molecular studies on terricolous microfungi reveal novel anamorphs of two Tuber species. *Mycological Research* **108**: 749–758.
- Vincenot L. 2009.** De l'individu à l'espèce: structure génétique multi-échelle des populations du basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria amethystina*. Manuscrit de thèse. Université de Montpellier.
- Violle C, Garnier E, Lecoœur J, Roumet C, Pothier C, Blanchard A, Navas M-L. 2009.** Competition, traits and resource depletion in plant communities. *Oecologia* **160**: 747–755.
- Visser S. 1995.** Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytologist* **129**: 389–401.
- Vittadini C. 1831.** *Monographia Tuberacearum*. Ex Typographia F. Rusconi.
- Wang Y, Cummings N, Guerin-Laguette A. 2012.** Cultivation of Basidiomycete edible ectomycorrhizal mushrooms: *Tricholoma*, *Lactarius*, and *Rhizopogon*. In: Zambonelli A, Bonito GM, eds. *Soil Biology. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Springer Berlin Heidelberg, 281–304.
- Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, Putten WH van der, Wall DH. 2004.** Ecological linkages between aboveground and belowground Biota. *Science* **304**: 1629–1633.
- Weden C, Chevalier G, Danell E. 2004.** *Tuber aestivum* (syn. *T. uncinatum*) biotopes and their history on Gotland, Sweden. *Mycological Research* **108**: 304–310.
- Whittaker RH. 1970.** *Communities and ecosystems*.
- Whittaker RH, Levin SA, Root RB. 1973.** Niche, habitat, and ecotope. *The American Naturalist* **107**: 321–338.
- Wiley EO. 1978.** The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Biology* **27**: 17–26.

- Worrall JJ. 1997.** Somatic incompatibility in Basidiomycetes. *Mycologia* **89**: 24–36.
- Wright S. 1931.** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**: 97–159.
- Yamada A, Kobayashi H, Ogura T, Fukada M. 2007.** Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling hosts. *Mycoscience* **48**: 104–108.
- Yamada A, Maeda K, Kobayashi H, Murata H. 2005.** Ectomycorrhizal symbiosis in vitro between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring ‘shiro’. *Mycorrhiza* **16**: 111–116.
- Zambonelli A, Bonito GM (Eds.). 2012.** *Edible Ectomycorrhizal Mushrooms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Zampieri E, Rizzello R, Bonfante P, Mello A. 2012.** The detection of mating type genes of *Tuber melanosporum* in productive and non productive soils. *Applied Soil Ecology* **57**: 9–15.
- Zeder MA. 2015.** Core questions in domestication research. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 3191–3198.
- Zeller B, Bréchet C, Maurice JP, Le Tacon F. 2008.** Saprotrophic versus symbiotic strategy during truffle ascocarp development under holm oak. A response based on ¹³C and ¹⁵N natural abundance. *Annals of forest science*: 1.
- Zeyl C, Bell G. 1997.** The advantage of sex in evolving yeast populations. *Nature* **388**: 465–468.

Encadré A1 : La notion d'espèce

Dans son article de 1997, Mayden identifie 22 concepts de l'espèce, qu'il divise en deux catégories, théoriques et opérationnelles. Le concept d'**espèce évolutive** qui découle de la notion de l'évolution darwinienne (Wiley, 1978), ne donne pas de critère de caractérisation et reste donc théorique, sauf à la rigueur sous la forme d'**espèce phylogénétique** où la position sur un ou plusieurs arbres phylogénétiques détermine l'appartenance à l'espèce (Taylor *et al.* 2000 ; pour des exemples d'application aux champignons, cf. Bellanger *et al.*, 2015 ; Richard *et al.*, 2014). La notion d'**espèce biologique** est basée sur des observations de comportements et de traits biologiques qui déterminent la capacité des individus à se reproduire entre eux. Cette notion soulève un problème lorsqu'on considère que les processus de spéciation se passent en continu, et ne peuvent être constatés qu'*a posteriori*. De plus, en l'absence de reproduction sexuée chez certains eucaryotes et les bactéries, le critère d'interfécondité est inutilisable. La notion d'**espèce morphologique** (souvent intimement imbriquée aux observations biologiques) a permis aux taxonomistes d'établir et de nommer la diversité actuellement connue (Hibbett & Taylor, 2013). Cependant, la plasticité phénotypique des espèces peut être importante. Chez les champignons notamment, l'aspect du mycélium et des spores peut varier en fonction du substrat, de l'humidité et de la température (Slepecky & Starmer, 2009). Par ailleurs, la morphologie peut varier dans certains groupes d'espèces. Les Cortinaires du groupe *Calochroi* en sont un bel exemple (Froslev *et al.*, 2007) : alors que l'école des mycologues scandinaves recense 60 espèces morphologiques, celle des méditerranéens en reconnaît 140 (Jean-Michel Bellanger, com. pers.). Opérationnellement, l'**espèce moléculaire** est souvent utilisée en écologie moléculaire sous le nom d'OTU (Encadré 7) : elle est basée sur la ressemblance (% de similitude) au niveau d'un gène pour la délimitation des espèces.

Merci pour votre lecture attentive!

