



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Collegium Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement



Institut National de la Recherche Agronomique

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine**

en Biologie Végétale et Forestière

par **Aurore Coince**

**RICHESSSE ET DIVERSITÉ DES ASSEMBLAGES DE CHAMPIGNONS  
ET D'OOMYCÈTES DE HÊTRAIES, EN RELATION AVEC DES FACTEURS  
CLIMATIQUES ET ÉDAPHIQUES : DE LA PARCELLE AU CONTINENT**

Soutenance publique le 3 octobre 2013

### **Membres du jury :**

Pr. Monique Gardes	Professeur, Université Paul Sabatier, Toulouse	Rapporteur
Dr. Roberto Geremia	Directeur de Recherches, CNRS, Grenoble	Rapporteur
Dr. Lionel Ranjard	Directeur de Recherches, INRA, Dijon	Examineur
Pr. Eric Gelhaye	Professeur, Université de Lorraine, Nancy	Examineur
Dr. Benoît Marçais	Directeur de Recherche, INRA, Nancy	Directeur de thèse
Dr. Marc Buée	Chargé de Recherche, INRA, Nancy	Co-directeur de thèse



UMR INRA/Université de Lorraine Interactions Arbres-Microorganismes  
Ecologie des champignons pathogènes forestiers & Ecogénomique des interactions  
Centre INRA de Champenoux – 54280 Champenoux

...

« De sorte que toute la suite des hommes, pendant le cours de tant de siècles, doit être considérée comme un même homme qui subsiste toujours et qui apprend continuellement ... »

Pascal, Préface au Traité du Vide

...

Je, soussignée Aurore Coince, déclare avoir écrit ce manuscrit et porter l'entière responsabilité des erreurs ou oublis qui pourraient subsister malgré les relectures.

Aurore Coince

## ***TABLES DES MATIERES***

<b><i>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....</i></b>	<b><i>6</i></b>
<b><i>INTRODUCTION .....</i></b>	<b><i>9</i></b>
1. Les communautés microbiennes eucaryotes telluriques forestières .....	9
1.1. Définitions et concepts .....	9
1.2. Fonctions écosystémiques et rôle structurant.....	10
1.2.1. Participation aux cycles biogéochimiques .....	10
1.2.2. Structuration des communautés végétales .....	11
1.3. Caractéristiques générales .....	13
1.3.1. Les différentes formes morphologiques et mode de vie.....	13
1.3.2. Les différents groupes taxonomiques.....	15
1.4. Diversité .....	16
1.4.1. Concepts .....	16
1.4.2. La diversité en chiffres .....	17
1.4.3. Maintien de la diversité.....	17
2. Méthodes et outils de description des communautés microbiennes.....	19
2.1. Problématique de l'échantillonnage .....	19
2.1.1. Le grain.....	19
2.1.2. L'intervalle et l'étendue .....	20
2.2. Méthodes de détection et de caractérisation.....	21
2.2.1. Les méthodes non-moléculaires.....	21
2.2.2. Les bases des méthodes moléculaires.....	23
2.2.3. Les méthodes d'analyse moléculaire.....	25
2.3. Atouts et défis de l'analyse haut-débit d'amplicons.....	27
2.3.1. Les atouts.....	27
2.3.2. Les limitations.....	28
3. Distribution et facteurs de structuration des communautés eucaryotes telluriques forestières.....	31
3.1. Hétérogénéité spatiale et temporelle .....	32
3.1.1. Structure verticale .....	32
3.1.2. Structure horizontale .....	33
3.1.3. Structure le long de gradients environnementaux.....	33
3.2. Structuration par les facteurs biotiques.....	36
3.3. Structuration par les facteurs édaphiques.....	38
3.4. Structuration par les facteurs climatiques.....	40
<b><i>DEMARCHE EXPERIMENTALE.....</i></b>	<b><i>42</i></b>

<b>CHAPITRE I. ETUDE PILOTE A L'ECHELLE LOCALE D'UNE PARCELLE.....</b>	<b>47</b>
1.    Problématique.....	47
2.    Méthodologie.....	47
3.    Résultats .....	49
<b>CHAPITRE II. DIVERSITE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES LE LONG DE GRADIENTS D'ALTITUDE .....</b>	<b>50</b>
1.    Problématique.....	50
2.    Méthodologie.....	50
3.    Résultats .....	52
<b>CHAPITRE III. DIVERSITE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES ET OOMYCETES LE LONG D'UN GRADIENT LATITUDINAL EUROPEEN.....</b>	<b>54</b>
1.    Problématique.....	54
2.    Méthodologie.....	54
3.    Résultats .....	55
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>74</b>
1.    Stratégie d'échantillonnage .....	74
1.1.    Type d'échantillon .....	74
1.2.    Profondeur de sol .....	75
1.3.    Nombre d'arbres échantillonnés (étendue).....	77
1.4.    Profondeur de séquençage.....	78
1.5.    Nombre de parcelles (variabilité inter-parcelle et inter-gradient) .....	79
2.    Richesse et composition des communautés fongiques .....	80
2.1.    Relation au climat .....	80
2.1.1.    Richesse.....	80
2.1.2.    Composition .....	81
2.2.    Relation aux variables édaphiques .....	83
2.2.1.    Richesse.....	83
2.2.2.    Composition .....	83
3.    La détection des Pythiacées : des difficultés à surmonter.....	84
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>88</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>105</b>
 <i>RESUMES english/français</i>	

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b>	Les axes et les groupes de travail (WP) du projet Européen BACCARA (2009-2012).	8
<b>Figure 2.</b>	Illustration des formes vivantes de champignons et oomycètes.	12
<b>Figure 3.</b>	Répartition de 216 espèces fongiques inventoriées sur un site forestier selon leur statut trophique.	14
<b>Figure 4.</b>	Classification actuelle des Fungi et des Oomycètes.	14
<b>Figure 5.</b>	Description de nouvelles espèces d'oomycètes au cours du temps.	18
<b>Figure 6.</b>	Démarche expérimentale d'étude des communautés à partir d'une approche moléculaire.	22
<b>Figure 7.</b>	Methodologie de traitement bioinformatique des données issues du séquençage.	22
<b>Figure 8.</b>	Région ITS de l'ADN ribosomal et sites d'hybridation des amorces.	24
<b>Figure 9.</b>	Gradients de diversité généralement observés chez les plantes et les animaux le long de gradients géographiques.	34
<b>Figure 10.</b>	Aire de répartition du hêtre. Source : EUFORGEN, 2009, www.euforgen.fr	44
<b>Figure 11.</b>	Modélisation de l'aire climatique de répartition du hêtre en France.	44
<b>Figure 12.</b>	Plan du site de Lignéville (Vosges).	48
<b>Figure 13.</b>	Etude des communautés fongiques et oomycètes dans quatre compartiments distincts.	48
<b>Figure 14.</b>	Localisation des sites échantillonnés le long de gradients.	51
<b>Figure 15.</b>	Localisation of the 31 sites sampled across a European latitudinal gradient.	58
<b>Figure 16.</b>	Climatic variables across the latitudinal gradient.	60
<b>Figure 17.</b>	Histogram of the MOTUs frequency.	60
<b>Figure 18.</b>	Rarefaction curves for each site of the latitudinal gradient.	62
<b>Figure 19.</b>	Relationships between richness and environmental variables.	64
<b>Figure 20.</b>	Correspondence analysis of the samples according to the assemblage.	66
<b>Figure 21.</b>	Relationships between the fungal assemblage and environmental variables.	68
<b>Figure 22.</b>	Significant relationships between the mycorrhizal assemblage and environmental variables.	70

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b>	Comparaison des caractéristiques générales des trois études.	46
<b>Tableau 2.</b>	Environmental table describing the 31 sites of the latitudinal gradient.	58
<b>Tableau 3.</b>	Twenty most abundant MOTU	62
<b>Tableau 4.</b>	Variabilité intrasite de la richesse fongique	76

## PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Pour gérer, protéger, voire réhabiliter un écosystème, il est indispensable de le comprendre. Cette compréhension repose sur la connaissance des composants et du fonctionnement de l'écosystème (Guinberteau & Courtecuisse, 1997).

Les microeucaryotes forestiers, tels que les champignons et oomycètes, sont des acteurs majeurs de l'écosystème de par leur abondance et de par les fonctions qu'ils assurent.

L'étude de la biodiversité, des effets directs ou indirects des pressions du milieu sur les écosystèmes, et la conception de méthodes et outils pour le suivi de ces écosystèmes font partie des domaines de recherches du département INRA Ecologie des forêts, prairies et milieux aquatiques (EFPA). Les travaux de recherche de l'UMR Interactions Arbres-Microorganismes s'inscrivent dans ces domaines et portent notamment l'accent sur les champignons symbiotiques.

Le projet européen BACCARA (Biodiversity And Climate Change : A Risk Analysis) s'inscrit quant à lui dans le contexte des changements globaux et s'est notamment donné pour objectif scientifique d'évaluer l'impact du changement climatique sur les communautés végétales et les communautés d'organismes associées telles que celles des herbivores, des champignons et oomycètes pathogènes. Plus largement, le projet BACCARA est guidé par trois axes : le changement climatique, le fonctionnement forestier et la biodiversité. Plusieurs groupes de travail ont tenté de comprendre les liens entre ces trois axes (Figure 1). Particulièrement, cette thèse s'inscrit dans le groupe concernant la réponse de la diversité au changement climatique. Un deuxième groupe de travail s'est focalisé sur l'effet de la biodiversité forestière sur le fonctionnement de l'écosystème et un troisième groupe s'est donc intéressé à la problématique de l'impact du changement climatique sur le fonctionnement forestier *via* la modification de la biodiversité.

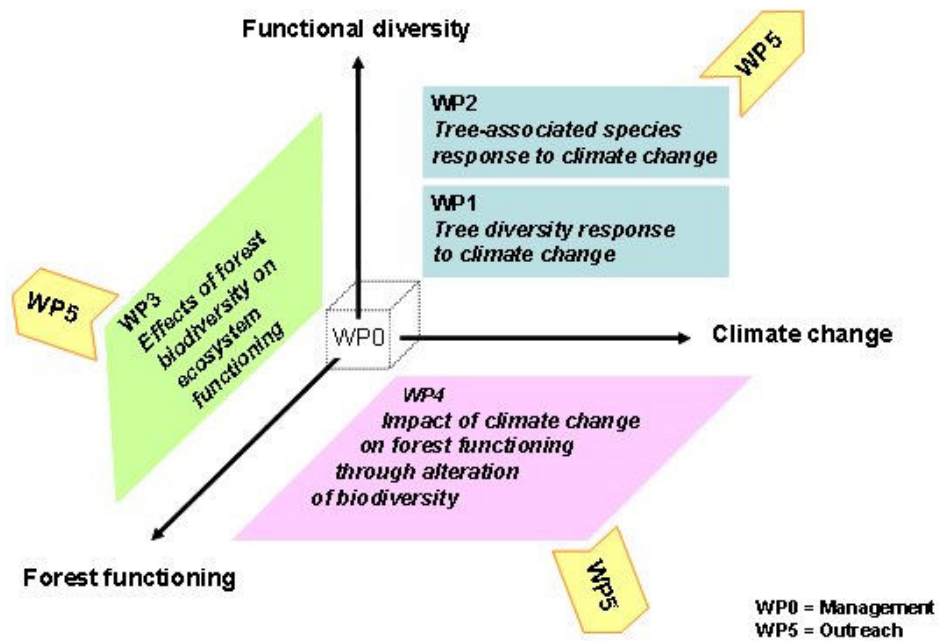
Pour les communautés microbiennes, comme celles des champignons et des oomycètes, le pré-requis majeur à l'évaluation de l'impact du changement climatique est une meilleure connaissance de la réponse de ces organismes aux variables climatiques, et en particulier à la température.

Dans le but de mieux évaluer l'influence des paramètres environnementaux sur la structure de ces communautés des organismes eucaryotes filamenteux, il est légitime de I) développer les outils permettant d'étudier ces espèces microbiennes et II) d'acquérir et diffuser des connaissances fondamentales sur l'écologie de ces communautés.

Concrètement, les objectifs ont été de :

- i) décrire, en terme de diversité et de structure, les communautés fongiques et d'oomycètes à différentes échelles spatiales (locale, régionale et continentale),
- ii) caractériser les variables abiotiques, notamment climatiques et édaphiques, structurant ces communautés,
- iii) évaluer l'importance relative de ces différents facteurs pédoclimatiques le long de gradients géographiques.





**Figure 1.** Les axes et les groupes de travail (WP) du projet Européen BACCARA (2009-2012).

# INTRODUCTION

Le sol forestier est un habitat réservoir de microorganismes. En effet, les bactéries, les champignons et les oomycètes sont des composants de l'écosystème forestier, et participent activement à son fonctionnement, en particulier par leur implication dans la dynamique des cycles biogéochimiques. A ce jour, les connaissances sur la diversité et les facteurs de structuration de ces communautés microbiennes sont encore incertaines et constituent un front de science activement étudié (Buée *et al.*, 2009 ; Fierer *et al.*, 2009 ; Peay *et al.*, 2010 ; Tedersoo & Nara, 2010).

En tant que microorganismes, les avancées obtenues à propos des bactéries, profitent aux études sur les champignons. Généralement, les connaissances en écologie des communautés bactériennes précèdent celles sur les champignons. Les communautés bactériennes (procaryotes) sont dominantes dans les sols forestiers et sont plus extensivement étudiées que les communautés fongiques (eucaryotes). En effet, les bactéries sont extrêmement nombreuses et diverses. Les estimations par gramme de sol sont de l'ordre de  $4.2 \times 10^{10}$  cellules bactériennes (comptage par microscopie) à  $4.2 \times 10^6$  unités formant colonies (comptage sur boîtes de Petri) pour plusieurs milliers d'espèces différentes (Torsvik & Øvreås, 2002 ; Schloss & Handelsman, 2006 ; Uroz *et al.*, 2011a). Dans une étude métagénomique, Uroz *et al.*, 2013 montrent que les bactéries seraient ainsi 100 à 1000 fois plus abondantes que les champignons sur la base de la séquence de l'ARN ribosomal, et représenteraient jusqu'à 94% des séquences ADN connues dans le sol. Les bactéries sont impliquées dans les cycles biogéochimiques, par exemple dans l'altération des minéraux et des composés organiques (Uroz *et al.*, 2011b ; Lepleux, 2012 ; Uroz *et al.*, 2013).

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'intéressent principalement aux champignons et aux oomycètes mais feront quelques références aux bactéries dans la partie discussion.

## 1. Les communautés microbiennes eucaryotes telluriques forestières

### 1.1. Définitions et concepts

Une communauté est l'ensemble des espèces, formant chacune une population, coexistant dans un espace géographique donné. Un assemblage correspond à un groupe d'organismes taxonomiquement proches. Le terme 'assemblage' est donc plus restrictif. Communauté et

assemblages peuvent se décrire selon leur structure et leur fonctionnement. La notion de structure regroupe plusieurs caractéristiques de la communauté (Ricklefs & Miller, 2000 ; Koide *et al.*, 2011) :

- la richesse (le nombre d'espèces)
- l'abondance (le nombre d'individus de chaque population)
- la composition (l'identité des espèces)
- la nature de la répartition des espèces dans l'espace (par exemple uniforme ou non)
- la nature des interactions entre les taxons (par exemple, compétition ou mutualisme).

Le fonctionnement concerne les flux d'énergie et de matière, la productivité et la résilience aux perturbations (Ricklefs & Miller, 2000).

Cette thèse s'intéresse à la richesse, la composition et la répartition dans l'espace des communautés microbiennes.

## **1.2. Fonctions écosystémiques et rôle structurant**

Les microorganismes du sol assurent des fonctions essentielles à la pérennité de l'écosystème forestier. Notamment les champignons interviennent de façon déterminante dans les cycles biogéochimiques par leur capacité de dégradation de la matière organique et influencent fortement les communautés végétales, de par des effets mutualistes et/ou parasitaires sur ces dernières.

### **1.2.1. Participation aux cycles biogéochimiques**

Les microorganismes participent aux cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du phosphore notamment (Robinson *et al.*, 2005 ; Smith & Read, 2008 ; Singh *et al.*, 2010). Par exemple, les microorganismes contribuent au cycle du carbone par le stockage de carbone (forte biomasse d'organismes fongiques dans les sols), les processus de respiration hétérotrophe et la décomposition de la matière organique, comme la litière ou le bois mort (Lindahl *et al.*, 2007 ; Rajala *et al.*, 2010 ; Clemmensen *et al.*, 2013). De cette manière, les champignons saprophytes et symbiotiques, grâce à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la matière organique, participent au recyclage des éléments nutritifs et donc au maintien de la fertilité du sol (Buée *et al.*, 2005 ; Courty *et al.*, 2010). De plus, en transférant des nutriments à l'hôte végétal, les champignons symbiotiques agissent comme des fournisseurs de

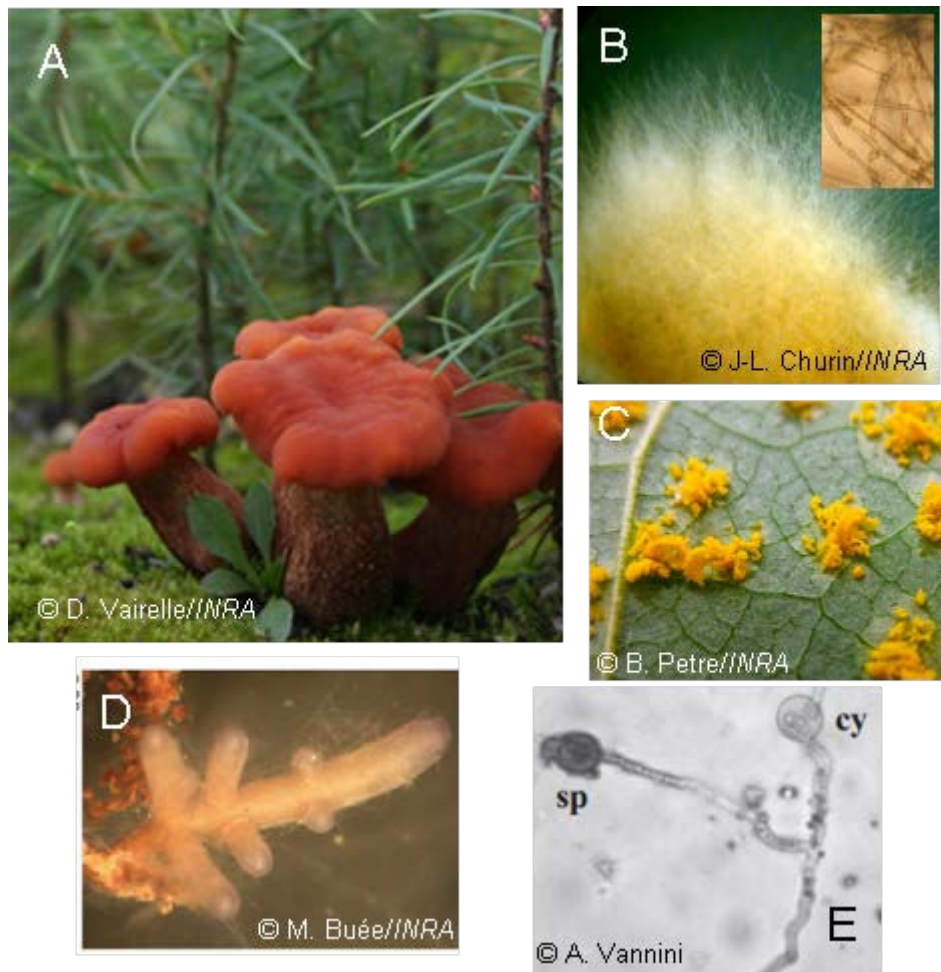
ressources en échange du carbone issu de la photosynthèse (Wolters *et al.*, 2000 ; Smith & Read, 2008).

### 1.2.2. Structuration des communautés végétales

Les communautés fongiques du sol affectent très fortement la structure des communautés végétales et en particulier leur diversité. Les champignons symbiotiques peuvent en effet modifier la diversité en végétaux de manière positive ou négative selon le contexte (van der Heijden *et al.*, 2008). Toutefois, ces conclusions concernent principalement les champignons mycorhiziens à arbuscules car ces phénomènes sont plus difficiles à mettre en évidence pour les champignons ectomycorhiziens (EcM) qui sont en association avec des plantes pérennes (Klironomos *et al.*, 2011). Le rôle de ces microorganismes serait pourtant crucial pour la colonisation des milieux par les plantes, en augmentant notablement leur croissance et en contribuant également à les protéger contre les agents pathogènes du sol. Par exemple, Hendrix *et al.* (1973) mentionnent le cas de la ‘Little leaf disease’ des pins engendrée par *Phytophthora cinnamomi* Rands qui infecte et détruit seulement les racines non mycorhizées et les apex racinaires. Quatre phénomènes ont été proposés pour expliquer cette protection des hôtes par les symbiontes :

- en établissant une barrière physique, le champignon symbiotique limite le contact entre l’agent pathogène et l’hôte végétal.
- le champignon établit une ‘barrière biochimique’ (communication/compétition moléculaire entre les microorganismes)
- le champignon entre en compétition avec l’agent pathogène pour la ressource carbonée (Stenstrom *et al.*, 1997)
- le champignon augmente la vigueur et la robustesse de l’hôte, ce qui améliore indirectement sa capacité de résistance aux agents pathogènes (Wehner *et al.*, 2010).

Parallèlement, les agents pathogènes agissent sur la structuration et la diversité des végétaux (Gilbert, 2002 ; Burdon *et al.*, 2006). Les oomycètes du genre *Phytophthora* sont par exemple connus pour provoquer des maladies sévères sur de nombreuses espèces de plantes, que ce soit en milieu agricole ou forestier (Erwin & Ribeiro, 1996). Par exemple, *Phytophthora ramorum* est impliqué dans la forte mortalité des chênes et des mélèzes ainsi que dans la maladie d’arbres ornementaux (Grünwald *et al.*, 2008) et *Phytophthora alni* induit des dépérissements chez les aulnes (Brasier *et al.*, 1995 ; Thoirain *et al.*, 2007).



**Figure 2.** Illustration des formes vivantes de champignons et oomycètes. (A) carpophore de *Laccaria bicolor*, (B) mycélium de *Paxillus involutus* en culture sur milieu gélosé, (C) urédospores de *Melampsora larici-populina*, agent de la maladie de la rouille foliaire du peuplier, (D) mycorhize de *Laccaria amethystina* et (E) *Phytophthora cambivora* (cyste et microsporangium) (Vannini et al., 2013 ; © 2013 Federation of European Microbiological Societies

Published by John Wiley & Sons Ltd. All rights reserved)

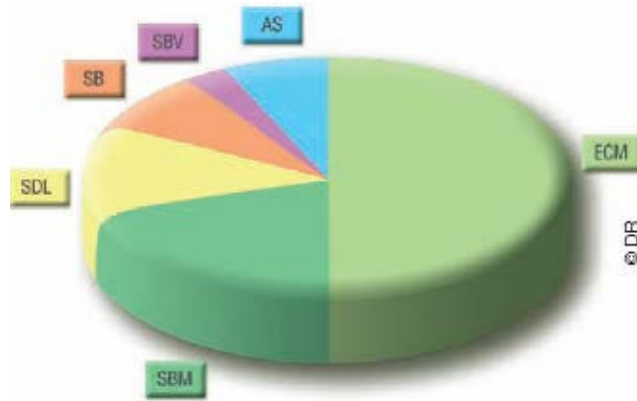
Plusieurs espèces du genre *Phytophthora* tels que *Phytophthora citricola* et *Phytophthora cambivora* sont pathogènes sur les hêtres et peuvent occasionnellement être impliquées dans des dépérissements (Jung *et al.*, 2005 ; Orlikowski *et al.*, 2006). Packer & Clay (2000) ont montré que la présence d'un autre genre oomycète, *Pythium*, dans le sol autour d'un cerisier noir (*Prunus serotina*) inhibe l'établissement de ses descendants mais pas ceux des autres espèces. Ainsi, cet agent pathogène influence la distribution spatiale de l'hôte car il force l'établissement des nouveaux individus à distance de l'arbre mère infecté ; par cette effet, il favorise la richesse locale en permettant l'établissement d'une autre essence à proximité de l'arbre mère (Packer & Clay, 2000 ; van der Putten *et al.*, 2000). En créant des perturbations locales, les organismes pathogènes influencent donc fortement la structure et la diversité des communautés végétales (Gilbert, 2002). En résumé, les champignons et oomycètes jouent un rôle écologique essentiel étant donné les multiples interactions et fonctions qui les lient entre eux et aux autres organismes forestiers.

### **1.3. Caractéristiques générales**

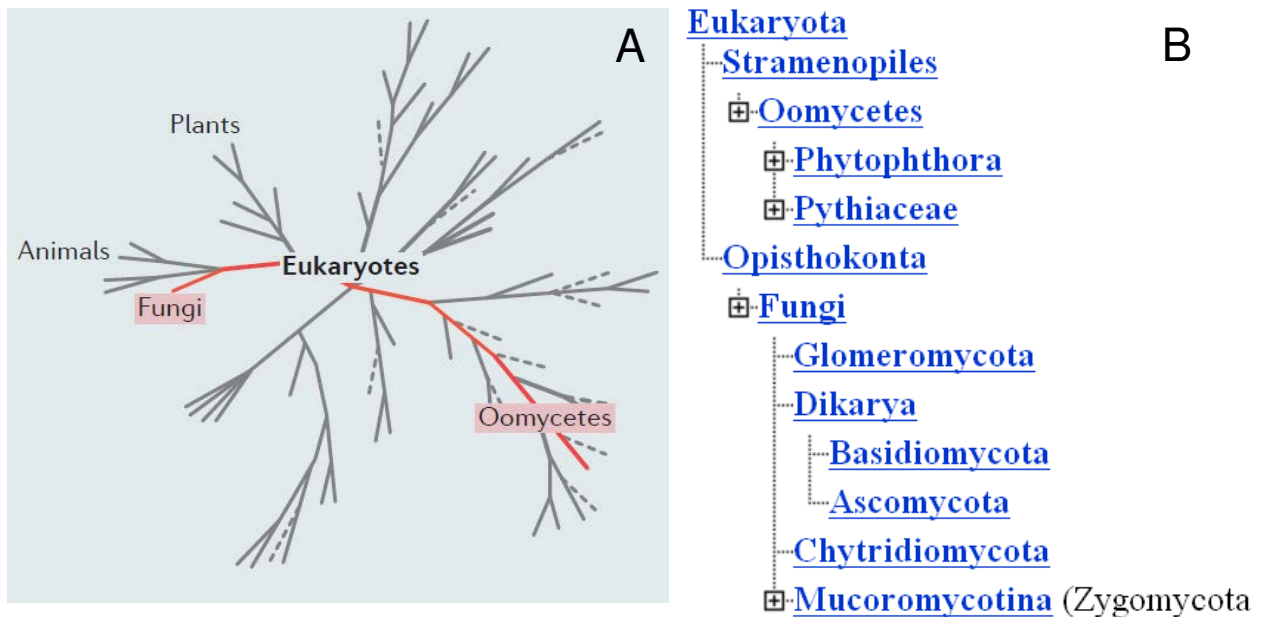
Les communautés de microorganismes du sol comprennent des organismes d'une grande diversité morphologique, phylogénétique et fonctionnelle. En effet, ces organismes peuvent prendre plusieurs formes, appartiennent à des groupes taxonomiques variés et présentent des modes de vie très diversifiés.

#### **1.3.1. Les différentes formes morphologiques et mode de vie**

Les champignons seraient les plus abondants en terme de biomasse dans le sol (Baldrian *et al.*, 2013 ; ) et peuvent produire jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques par gramme de sol (Leake *et al.*, 2004). Les oomycètes sont présents dans le sol mais certainement en moindre proportion. L'estimation est délicate car les études quantitatives sont généralement faites sur des tissus infectés (racines, feuilles) (Tomlinson *et al.*, 2005 ; Chandelier *et al.*, 2006). Les formes vivantes de ces organismes dans le sol sont le mycélium, la mycorhize et les propagules telles que les spores ou les sclérotés (Figure 2).



**Figure 3.** Répartition de 216 espèces fongiques inventoriées sur un site forestier selon leur statut trophique. La moitié des espèces sont des champignons ectomycorhiziens (ECM) et l'autre moitié comprend des champignons saprophytes vivant sur branches et tronc morts (SBM), ou sur arbre vivant (SBV) ou sur brindilles (SB), des saprophytes décomposeurs de litière (SDL) et d'autres saprophytes (AS). D'après Buée *et al.* (2006).



**Figure 4.** Classification actuelle des Fungi et des Oomycètes. (A) Arbre phylogénétique représentant le lien entre les oomycètes et les champignons. Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Microbiology] (Raffaele & Kamoun, 2012), copyright (2012). (B) Détail de quelques phyla et genres des Fungi et Oomycota. Noter que les Zygomycota sont reclassés dans plusieurs divisions dont celle des Mycoromycotina. [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree)

Le mycélium est la forme végétative d'un champignon et correspond à un réseau de filaments. Certaines espèces, telle l'armillaire, sont sous forme d'un cordon mycélien, nom mé rhizomorphe. La mycorhize est l'organe de la symbiose entre un apex racinaire d'un hôte végétal et une espèce de champignon. Plusieurs espèces de champignons peuvent coloniser les multiples apex racinaires d'un même hôte et même coexister au sein d'un même apex (Rosling *et al.*, 2003 ; Tedersoo *et al.*, 2009). Les propagules sont des formes de survie dont la viabilité peut être conservée plusieurs années (Nguyen *et al.*, 2012). Il existe le sclérote et la spore, qui sont des structures de survie ou de conservation, même si cette dernière forme inclue la notion de dispersion et de reproduction.

Les organismes peuvent être classés selon leur mode de vie, défini par le mécanisme d'acquisition des ressources. Les saprophytes (décomposeurs) utilisent le carbone de la nécromasse et les parasites détournent à leur profit le carbone d'un végétal autotrophe vivant. Selon la nature de l'interaction avec l'hôte, les microorganismes sont dits 'commensaux' lorsqu'ils n'ont aucun effet sur l'état de l'hôte, 'pathogènes' lorsqu'ils occasionnent des dommages à l'hôte et 'symbiotiques' lorsqu'ils établissent avec l'hôte une relation à bénéfices réciproques.

Deux types de symbiose impliquant les champignons sont principalement décrites : la symbiose endomycorhizienne, qui concerne les herbacées et quelques arbres tels que l'érable et le frêne, et la symbiose ectomycorhizienne qui implique la plupart des espèces ligneuses (Smith & Read, 2008). Ainsi, les champignons ectomycorhiziens représentent une part très importante de la diversité fongique forestière. Par exemple, sur le site expérimental de Breuil-Chenue, Buée *et al.* (2011) ont montré que 50% des espèces fongiques telluriques identifiées sont ectomycorhiziennes (Figure 3). Cette proportion est toutefois très variable car elle peut s'élever à 70% selon les études (Richard *et al.*, 2004). Les autres champignons sont majoritairement des saprophytes et la part des agents pathogènes est mal connue.

### **1.3.2. Les différents groupes taxonomiques**

Les champignons et les oomycètes sont classés taxonomiquement dans des règnes différents (Figure 4 A et B). Le règne des champignons (Fonge ou flore fongique) se subdivise en sept phyla (Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia), 35 classes et 129 ordres sur la base d'une classification phylogénétique (Hibbett *et al.*, 2007 ; Figure 4B).



Le sous-règne des Dikarya (ensemble des Ascomycota et Basidiomycota), le plus étudié, est aussi le plus diversifié et le plus représenté dans le sol. Toutefois, d'autres groupes, notamment le genre des *Mortierella*, seraient encore incomplètement décrits (Nagy *et al.*, 2011). Les oomycètes, autrefois parmi les champignons, sont actuellement classés dans le règne des Straménopiles (Figure 4B ; Blair *et al.*, 2008). Ils comprennent des agents pathogènes forestiers, notamment dans les genres *Phytophthora* et *Pythium*. Le genre *Phytophthora* compte dix clades définis sur la base de la phylogénie de sept gènes nucléaires (Blair *et al.*, 2008). Toutefois, les estimations de diversité suggèrent fortement que les champignons et les oomycètes sont des groupes incomplètement décrits (Hibbett *et al.*, 2011 ; Kroon *et al.*, 2012).

## **1.4. Diversité**

### **1.4.1. Concepts**

La diversité est une propriété centrale en écologie et elle se décompose en deux informations complémentaires : la richesse taxonomique (le nombre de taxa) et l'abondance relative de chaque taxon au sein de la communauté (Konopka, 2009). La richesse spécifique correspond plus précisément au nombre d'espèces. Les mesures de richesse et diversité sont donc intimement liés à la définition d'une espèce. Or, le concept d'espèce est particulièrement complexe en écologie microbienne du fait de la nature microscopique et de la biologie même des organismes considérés. On distingue trois concepts d'espèce : phénotypique, biologique et phylogénétique selon les critères choisis pour regrouper des individus (Taylor *et al.*, 2000). Le concept dominant est celui de l'espèce phénotypique définie principalement sur des critères morphologiques. Face au manque de caractères morphologiques adéquats pour différencier certaines espèces, les taxonomistes se sont tournés vers d'autres critères. Le concept d'espèce biologique repose sur la notion d'interfécondité des individus, la viabilité et la fertilité de la progéniture et ne s'applique donc que pour les organismes à reproduction sexuée. Ce concept a permis de séparer des espèces difficiles à distinguer morphologiquement, par exemple chez les armillaires (Baumgartner *et al.*, 2011). Enfin, une espèce phylogénétique regroupe des individus ayant une généalogie concordante pour un ensemble de gènes, c'est-à-dire ayant un ancêtre commun. Cette concordance se base sur l'homologie de séquences nucléotidiques: plus l'homologie est grande, plus les individus sont phylogénétiquement proches. Ce troisième concept est utilisé pour montrer que *Cenococcum geophilum* serait un complexe de

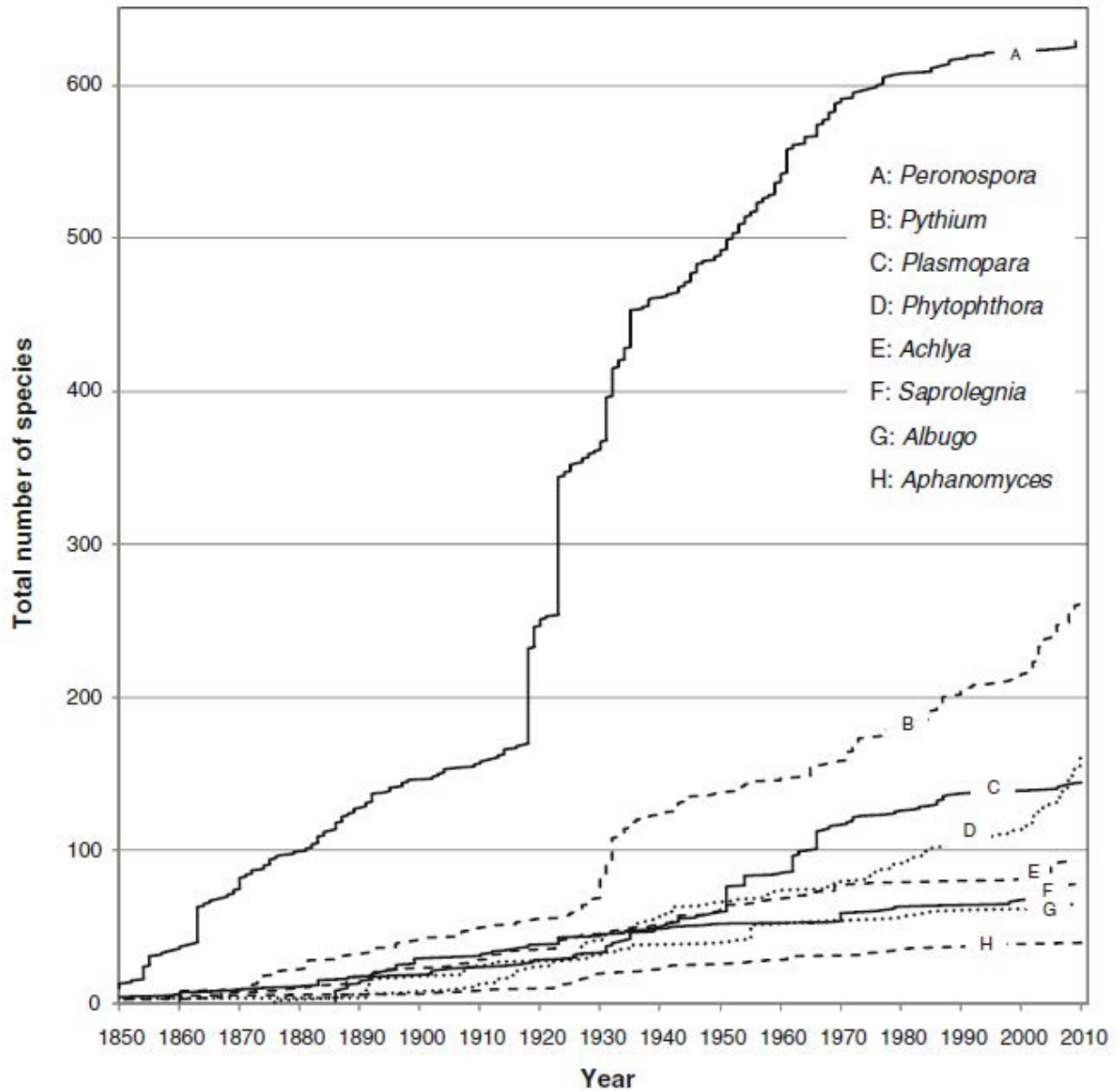
plusieurs espèces (Douhan *et al.*, 2007). Le seuil d'homologie à partir duquel deux individus sont considérés être de la même espèce peut être variable (discuté plus bas).

#### **1.4.2. La diversité en chiffres**

La diversité des champignons sur Terre est estimée entre 500 000 et 5,1 millions d'espèces (Bass & Richards, 2011). La question est toujours en débat et il est probable que ce qui est déjà décrit est encore peu représentatif de ce qui existe réellement (Bass & Richards, 2011 ; Hibbett *et al.*, 2011). La diversité des champignons EcM est quant à elle estimée entre 20 000 et 25 000 (Rinaldi *et al.*, 2008). La description très récente de la classe des Archaeorhizomyces (Rosling *et al.*, 2011) illustre bien le potentiel de diversité du règne fongique. Concernant les oomycètes, plus d'une centaine d'espèces appartenant au genre *Phytophthora* a été identifiée à ce jour dont la moitié durant la dernière décennie (Figure 5 ; Kroon *et al.*, 2012) et Brasier (2009) estime que 200 à 600 espèces pourraient exister. Pour le genre *Pythium*, environ 250 espèces ont été recensées mais la description de nouvelles espèces s'est également accélérée durant la dernière décennie (Figure 5 ; Levesque, 2011). Ceci révèle que les oomycètes pathogènes, tout comme les champignons, sont encore mal connus, d'autant plus que pour les oomycètes, les récentes descriptions concernent des espèces détectées dans des forêts tempérées et non pas des habitats extrêmes beaucoup moins explorés.

#### **1.4.3. Maintien de la diversité**

Le maintien de la diversité résulte de plusieurs processus gouvernés chacun par de multiples facteurs permettant la coexistence de nombreuses espèces. La grande diversité observée pour les microorganismes du sol peut par exemple s'expliquer par la nature très hétérogène de cet habitat : diversité de micro-habitats, hétérogénéité des ressources, isolation spatiale liée à la faible dispersion dans le sol (Bruns, 1995). D'autre part, le haut degré de spécialisation dans l'utilisation des ressources octroie une forte compétitivité aux espèces et permet l'occupation de niches différentes. Dans le cas des espèces fortement associées aux plantes, la diversité des hôtes peut aussi expliquer en partie la forte diversité des microorganismes du fait de la spécificité d'hôte (Selosse, 2001 ; Bever *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2002 ; Bardgett *et al.*, 2005 ; Kernaghan, 2005). Le maintien de la diversité microbienne est un phénomène extrêmement complexe qui ne sera pas développé plus avant ici (voir Fierer, 2008).



**Figure 5.** Description de nouvelles espèces d’oomycètes au cours du temps. Noter la courbe D traduisant l’augmentation rapide du nombre d’espèces décrites pour le genre *Phytophthora* durant la dernière décennie. D’après Lévesque (2011). With kind permission from Springer Science and Business Media.

## **2. Méthodes et outils de description des communautés microbiennes**

L'étude des communautés en milieu naturel requiert une méthodologie d'échantillonnage et des outils de détection et de description. La méthodologie d'échantillonnage se rapporte à la nature et à la répartition des échantillons qui constituent l'unité de base de l'étude et les outils sont destinés à la caractérisation de la communauté présente dans ces échantillons. Méthodologie et outils doivent naturellement être adaptés aux objectifs de l'étude et à la nature des communautés étudiées. La conception d'une méthodologie expérimentale nécessite donc des connaissances préliminaires sur les communautés à étudier et requiert une évaluation pour apprécier sa pertinence, de même que les outils sont éprouvés pour leur capacité à bien décrire les communautés. D'autre part, il existe une interdépendance entre la méthode d'échantillonnage et les outils utilisés du fait de la puissance relative des outils mais aussi des contraintes environnementales, logistiques, temporelles et financières. Toute cette problématique s'applique aux communautés microbiennes en général (bactéries, champignons, oomycètes).

### **2.1. Problématique de l'échantillonnage**

La question de l'échantillonnage est cruciale pour décrire les patrons de distribution des espèces et déterminer les facteurs de structuration sous-jacents. Au moins trois notions caractérisent un plan d'échantillonnage : le grain, c'est-à-dire la taille de l'échantillon, l'intervalle (distance moyenne entre les échantillons) et l'étendue (ou échelle) c'est-à-dire la dimension de l'espace géographique considéré (Wiens, 1989 ; Borcard *et al.*, 2011).

#### **2.1.1. Le grain**

Le grain est une caractéristique très importante pour les études de communautés de microorganismes du sol. En effet, la structure de la communauté fongique est sensible à la taille de l'échantillon, c'est-à-dire la quantité de sol à partir duquel l'ADN est extrait dans le cas d'une approche moléculaire (Ranjard *et al.*, 2003). Ranjard *et al.*, 2003 montre que cette quantité de sol devrait être supérieure ou égale à 1g pour obtenir des résultats reproductibles. Toutefois, la dominance de certaines espèces dans des échantillons de grande taille peuvent limiter la détection des espèces rares. Cette évaluation pour l'étude des communautés

fongiques n'a pas été suffisamment approfondie, notamment pour l'aspect de la diversité, et n'a pas été réalisée pour les différents outils de détection.

Peay *et al.* (2008) argumentent qu'une description insuffisante de la communauté limite la capacité à discerner sa réponse à un facteur, en particulier à cause des nombreuses espèces cryptiques. Toutefois, Shaw *et al.* (2008) répliquent que pour étudier les patrons de distribution, l'exhaustivité n'est pas forcément nécessaire. Ils développent l'idée que ce qui est important n'est pas tant d'accéder à la diversité réelle mais plutôt de réussir à classer correctement les échantillons les uns par rapport aux autres sur la base de leur diversité. Ces auteurs montrent notamment, à partir de communautés bactériennes aquatiques, que les estimateurs de richesse généralement utilisés concordent et que le seuil de similarité définissant les espèces peut être fixé entre 95 et 99% sans grande perturbation du classement des échantillons.

### **2.1.2. L'intervalle et l'étendue**

Ces caractéristiques de l'échantillonnage dépendent surtout de la question posée et seront donc traitées de façon assez succincte. L'intervalle conditionne la taille minimale du patron spatial que l'on peut mettre en évidence (Borcard *et al.*, 2011). Le choix de l'intervalle et de l'étendue a des répercussions sur les patrons de distribution observés car les facteurs structurants les communautés microbiennes ne sont pas les mêmes selon l'échelle spatiale considérée (Wiens, 1989). Dans le cas des communautés EcM, l'étendue est rarement mentionnée dans les publications mais dépasse rarement 0,5 hectare pour un site (Taylor, 2002). Récemment, des études régionales et continentales ont été mises en œuvre afin d'étudier la biogéographie des microorganismes du sol (Cox *et al.*, 2010 ; ).

Les probabilités de détection des organismes sont clairement liées à la distribution spatiale et temporelle des espèces, qui est elle-même déterminée par le cycle biologique des organismes et les conditions environnementales (Taylor, 2002 ; Peay *et al.*, 2008). L'effort d'échantillonnage, c'est-à-dire le nombre d'échantillons à prélever pour décrire au mieux la communauté fongique ou oomycète d'une parcelle, doit également tenir compte de la variabilité des communautés fongiques en lien avec l'hétérogénéité du milieu mais il n'est pas clairement établi (Taylor, 2002). Ces informations doivent donc être également intégrées dans l'élaboration de la méthodologie. Aussi, il n'y a pas de directives standardisées pour échantillonner les communautés fongiques en milieu forestier (Taylor, 2002). Il existe encore moins d'informations pour les communautés oomycètes telluriques.

## 2.2. Méthodes de détection et de caractérisation

Concernant les champignons, trois types de méthodes permettent d'inventorier les espèces d'une communauté : (i) la caractérisation morphologique in situ, quand elle est possible, (ii) l'approche cultivable des taxa (isolement en conditions contrôlées) et (iii) les méthodes non cultivables, principalement représentées par les approches moléculaires à partir des acides nucléiques.

### 2.2.1. Les méthodes non-moléculaires

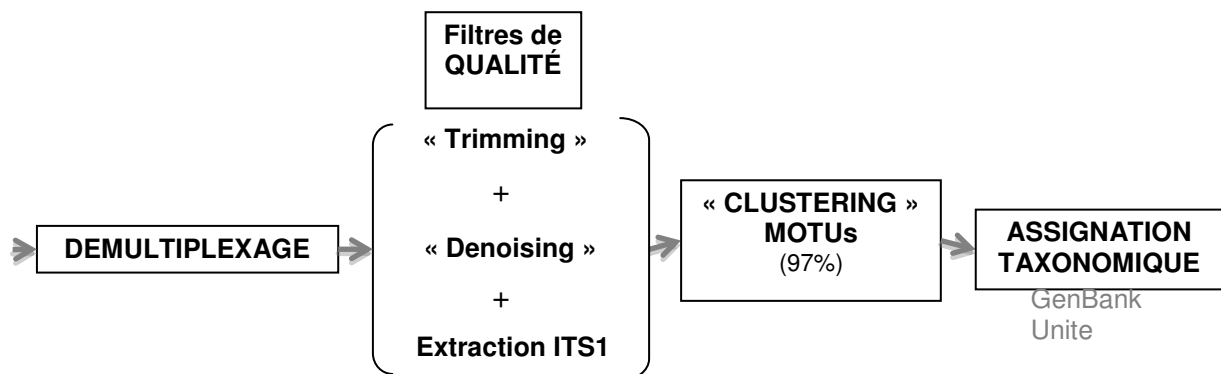
La plus ancienne méthode est l'inventaire des fructifications en milieu naturel. Cette méthode se base sur de l'observation sur le terrain et sur une grande expertise de détermination de la part de l'observateur. De plus, la formation des fructifications nécessite des conditions environnementales particulières qui ne sont généralement pas les mêmes d'une espèce à l'autre et qui ne sont pas réunies tous les ans. De ce fait, la diversité des carpophores à un moment donné ne reflète pas la diversité de la population fongique du sol mais plutôt la 'partie émergée de l'iceberg' (Dahlberg, 2001 ; Horton & Bruns, 2001 ; Taylor, 2002). L'utilisation de cette méthode d'observation implique un suivi répété sur de nombreuses années (ordre de grandeur de la décennie) pour estimer la richesse à un endroit donné (Straatsma *et al.*, 2001 ; Buée *et al.*, 2011) et ce suivi pourrait de ce fait être biaisé par le phénomène de succession (Blaalid *et al.*, 2012 ; Guinberteau & Courtecuisse, 1997 ; Frankland, 1998 ) ou des perturbations dans la gestion de l'écosystème, comme l'ouverture du peuplement en forêt (Egli *et al.*, 2010). L'observation et la caractérisation par identification anatomo-morphologique des apex mycorhiziens permettent de remédier en partie à ces limitations, mais essentiellement pour les espèces ectomycorhiziennes (Agerer, 2001 ; Selosse, 2001 ; Taylor, 2002).

Une autre possibilité est de caractériser une partie de la communauté, après isolement par cultures en milieu contrôlé ou par piégeage dans le cas des agents pathogènes (Arcate *et al.*, 2006 ; Cooke *et al.*, 2007 ; Fichtner *et al.*, 2007 ; O'Brien *et al.*, 2009). Cette possibilité implique une sélection des espèces cultivables dans les conditions de culture en laboratoire ou des espèces capables d'infecter un piège, et doit être couplée avec une étape d'identification.

En conclusion, ces méthodes, qui ont historiquement fait leurs preuves, restent cependant lourdes à mettre en œuvre et sont par nature de faible débit.



**Figure 6.** Démarche expérimentale d'étude des communautés à partir d'une approche moléculaire. D'après Lindahl *et al.* (2013). © 2013 The Authors. New Phytologist © 2013 New Phytologist Trust



**Figure 7.** Methodologie de traitement bioinformatique des données issues du séquençage.

Ces difficultés expliquent en partie un relatif retard dans l'avancée des connaissances sur les microorganismes par rapport à d'autres organismes plus faciles à appréhender tels que les plantes ou les animaux.

### **2.2.2. Les bases des méthodes moléculaires**

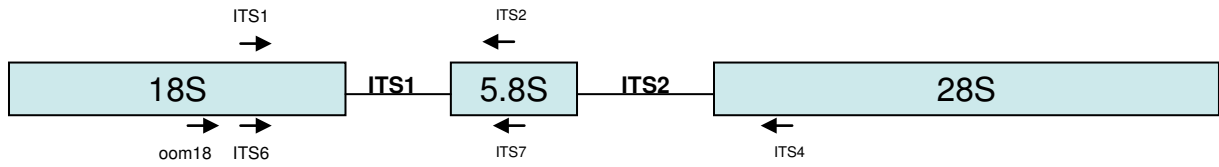
Depuis une vingtaine d'année, les techniques moléculaires ont progressivement pris le pas sur l'identification anatomo-morphologique pour plusieurs raisons. D'une part, les méthodes précédentes présentent des limites de détection, avec notamment l'impasse sur ce qui reste invisible, ce qui est éphémère ou ce qui est difficile à isoler, et des difficultés pour l'étape d'identification (plasticité phénotypique du vivant, grande expertise requise). D'autre part, les avancées technologiques ont permis le développement d'outils moléculaires pour l'examen du polymorphisme génétique (Drenth *et al.*, 2006 ; Nocker *et al.*, 2007). Notamment, la technique d'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a révolutionné la manière de décrire le vivant à partir des années 1990. Il s'agit non plus de se baser sur l'organisme lui-même ou ses propriétés pour le définir, mais de se contenter de son ADN. Les étapes principales des méthodes moléculaires sont le prélèvement d'échantillons, le sous-échantillonnage d'une petite quantité, l'extraction d'ADN à partir de ces sous-échantillons, l'amplification PCR, le séquençage et l'analyse bioinformatique des données (Figure 6 et Figure 7).

Ces approches moléculaires nécessitent l'usage d'un marqueur génétique ('barcoding'). Ce marqueur désigné 'code barre' est un fragment du génome. Le code barre idéal est une région qui doit être :

- variable, c'est-à-dire que le niveau de variabilité interspécifique minimal doit être supérieur au niveau maximal de variabilité intraspécifique
- standard, c'est-à-dire utilisable pour différents groupes taxonomiques
- suffisamment informative phylogénétiquement pour permettre l'assignation des espèces inconnues à un groupe taxonomique
- robuste, c'est-à-dire facilement amplifiable par PCR
- courte (en général moins de 1000 paires de base) (Valentini *et al.*, 2009).

La région ciblée pour l'étude des champignons et oomycète est l'unité de l'ADN ribosomal nucléaire. Cette unité est répétée, c'est-à-dire qu'il y a plusieurs copies dans l'ensemble du génome et cette propriété facilite donc l'amplification PCR.





**Figure 8.** Région ITS de l'ADN ribosomal et sites d'hybridation des amorces. Les amorces pour l'amplification des champignons sont situées au dessus et celles pour les oomycètes au dessous. Le sens de la flèche indique de sens de polymérisation du br in complémentaire lors de la réaction d'amplification. Les rectangles bleus indiquent les régions hyperconservées encadrant les régions ITS1 et ITS2 plus polymorphes. Remarque : les amorces fongiques portent le même nom que ces deux régions.

Cette région comprend des zones très conservées (18S, 5.8S, 28S), dont les transcrits serviront d'ARN ribosomiaux, séparées par des espacements soit transcrits (internal transcribed spacer : ITS) qui sont des régions moins conservées, soit non transcrits (intergenic spacer : IGS) qui sont des régions très peu conservées (Figure 8) (Selosse, 2001). Les régions hyperconservées flanquant les ITS permettent l'utilisation d'amorces universelles pour l'amplification PCR. Aussi, l'ensemble englobant les zones ITS1, 5.8S et ITS2, nommé 'région ITS', a été proposé par la communauté scientifique comme code barre consensuel pour les champignons et les oomycètes (Gardes & Bruns, 1993 ; Cooke *et al.*, 2000 ; Lévesque & de Cock 2004 ; Nilsson *et al.*, 2009 ; Seifert, 2009 ; Begerow *et al.*, 2010 ; Robideau *et al.*, 2011 ; Schoch *et al.*, 2012). La région codant la sous-unité I de la cytochrome c oxydase (COI, COX1) est également validée pour l'étude des oomycètes (Robideau *et al.*, 2011). L'utilisation d'autres séquences cibles, telle que celle du gène codant la protéine YPT1, est également possible pour la description d'agents pathogènes forestiers connus (Schena *et al.*, 2008). Mais, la caractérisation des communautés se base aussi sur la comparaison de ces séquences avec ce qui est déjà décrit et répertorié. Le choix d'un marqueur repose donc sur la disponibilité, la taille et la qualité des bases de données associant l'information taxonomique avec l'information sur le code barre. En l'occurrence, la région ITS est très bien représentée dans les bases de données par rapport aux autres marqueurs.

### **2.2.3. Les méthodes d'analyse moléculaire**

Plusieurs techniques consistent en une comparaison de profils (empreintes) avec ou sans caractérisation des espèces constituant la communauté (Anderson & Cairney, 2004). C'est le cas de l'analyse automatique de l'espace intergénique ribosomal (ARISA) (Ranjard *et al.*, 2003 ; Gorzelak *et al.*, 2012), de l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Zinger *et al.*, 2008), de l'analyse du polymorphisme de conformation de l'ADN monocaténaire (SSCP) (Zinger *et al.*, 2008), de l'analyse du polymorphisme nucléotidique par électrophorèse de l'ADN en gradient de gel dénaturant ou de température (DGGE ou TGGE). Les principes de ces techniques sont notamment décrits en français par Tagu *et al.* (2003) et les apports et limites de ces techniques sont synthétisés par Anderson & Cairney (2004).

D'autres techniques s'appuient sur la connaissance de la composition et de l'enchaînement des nucléotides. C'est le cas des techniques utilisant des sondes oligonucléotidiques, comme les puces à ADN (Bruns & Gardes, 1993 ; Reich *et al.*, 2009) ou du séquençage.

Ces dernières années, le séquençage a connu un développement spectaculaire et se réalise à présent en haut-débit, c'est le cas du pyroséquençage et des techniques de type Illumina. L'ensemble des techniques haut-débit est d'ailleurs toujours en cours d'optimisation et elles sont regroupées sous le terme générique de 'nouvelle génération de séquençage' (NGS).

Les outils informatiques se développent également en parallèle pour les étapes d'analyse des données. Ces principales étapes sont le nettoyage du jeu de données ('filtering' et 'denoising'), le regroupement des séquences ('clustering') et l'assignation taxonomique (Figure 7).

Ainsi, les séquences obtenues par séquençage sont regroupées sur la base de leur similarité nucléotidique, tout comme des individus échantillonnés sont regroupés en espèces sur la base de leurs caractéristiques. Ces groupes de séquences correspondent dans l'idéal aux espèces et sont désignés unités taxonomiques opérationnelles moléculaires (MOTU ou simplement OTU, Blaxter *et al.*, 2005). Le critère clef est le seuil de similarité entre les séquences ; il est le plus souvent établi à 97% (O'Brien *et al.*, 2005 ; Buée *et al.*, 2009 ; Amend *et al.*, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2010a ; Bahram *et al.*, 2012) bien que non adéquat pour l'ensemble du règne fongique (Nilsson *et al.*, 2008 ; Blaaid *et al.*, 2013). En effet, Nilsson *et al.* (2008) ont estimé la variabilité de la région ITS entre 1,96 et 7,46% selon le phylum fongique et ces valeurs extrêmes correspondent respectivement aux Ascomycota et aux Glomeromycota. Toutefois, ce seuil de 97% semble, pour les champignons, être un consensus pertinent (Tedersoo *et al.*, 2010a). Dans le cas des *Phytophthora*, le seuil le plus approprié serait plutôt de 98% (Vettraino, communication personnelle). Il s'agit ensuite d'assigner taxonomiquement les MOTU en comparant les séquences environnementales à celles disponibles dans les bases de données publiques [par exemple, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), National Center for Biotechnology Information (NCBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) ou User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhizal database (UNITE) (Kõljalg *et al.*, 2005), Phytophthora-ID (Grünwald *et al.*, 2011)]. Ainsi, les résultats taxonomiques sont à considérer comme étant des similarités entre séquences et non pas comme des assignations définitives (Nilsson *et al.*, 2012). En effet, l'utilisation d'un seuil de similarité unique (97 %) n'est pas adapté pour tous les groupes (voir ci-dessus) et l'interprétation du résultat de recherche par homologie de séquence (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) est parfois délicate (Begerow *et al.*, 2010 ; Nilsson *et al.*, 2008 ; Kang *et al.*, 2010). Nilsson *et al.* (2012) propose de vérifier plusieurs éléments pour limiter les erreurs d'interprétation : chaque séquence doit correspondre au marqueur ciblé, l'orientation des séquences doit être de 5' en 3', les séquences ne doivent pas être des chimères et les multiples résultats de BLAST doivent être

concordants pour une assignation taxonomique. Enfin, si leur existence est une condition *sine qua non* pour l'étude moléculaire des communautés microbiennes, les bases de données ne sont pourtant pas exhaustives, ni entièrement fiables (Vilgalys 2003 ; Bridge *et al.*, 2004 ; Nilsson *et al.*, 2006 ; Bidartondo *et al.*, 2008 ; Kang *et al.*, 2010). Par exemple, de nombreuses erreurs d'identification et d'annotation ont été relevées du fait d'erreur taxonomique, de séquençage non-intentionnel (contaminations ou symbiose par exemple) ou d'erreur humaine (mélange de tubes ou fichiers, mauvaise saisie) (Nilsson *et al.*, 2006 ; Nilsson *et al.*, 2012). Les bases de données doivent donc s'enrichir continuellement en parallèle des nouvelles découvertes et descriptions de champignons et bénéficier du développement de nouveaux outils de correction et curation (Nilsson *et al.*, 2006 ; Nilsson *et al.*, 2012).

### **2.3. Atouts et défis de l'analyse haut-débit d'amplicons**

Le séquençage haut-débit améliore considérablement notre capacité à écrire les communautés de microorganismes, en particulier le caractère massif et la possibilité de multiplier les échantillons ont été des apports déterminants. Il reste toutefois un certain nombre de limitations liées à l'étape de PCR, à la longueur limitée des séquences obtenues et au fort taux d'erreur. Cependant, les progrès de la technique de séquençage et du traitement bioinformatique sont rapides et constants.

#### **2.3.1. Les atouts**

Le caractère haut-débit s'explique par un gain d'efficacité dans la lecture des brins d'ADN et par la miniaturisation des systèmes de séquençage (Margulies *et al.*, 2005). La méthode de pyroséquençage est basée sur la détection du pyrophosphate libéré lors de l'incorporation du nucléotide (Ronaghi *et al.*, 1996 ; Shendure & Ji, 2008) et des milliers de réactions ont lieu en même temps. La quantité de séquences obtenues est ainsi multipliée, ce qui permet d'étudier la communauté au sein d'un échantillon avec une profondeur de séquençage 10 000 fois plus grande par rapport aux techniques classiques de séquençage, comme le séquençage Sanger. Il y a donc une plus grande sensibilité à détecter des espèces rares c'est-à-dire des espèces peu abondantes et peu fréquentes. L'ensemble de ces taxa parfois inconnus et très divers est qualifié de « biosphère rare » (Reeder & Knight, 2009). La détection de ces taxa est crucial pour identifier les facteurs structurants des communautés (Peay *et al.*, 2008). Par exemple, Arcate *et al.* (2006) ont obtenu une plus grande diversité de Péronosporales (oomycètes) en

utilisant l'ADN extrait directement à partir du sol rhizosphérique par rapport à la technique de piégeage sur feuille. De même, Williams *et al.* (2009) ont pu détecter *P. cinnamomi* avec une méthode moléculaire alors que le piégeage ne l'avait pas permis. Ainsi, le séquençage haut-débit a révélé que la diversité fongique était largement sous-estimée par les méthodes bas-débit (Buée *et al.*, 2009 ; Jumpponen *et al.*, 2009 ; Jumpponen *et al.*, 2010).

La multiplication des échantillons est permise par le multiplexage qui permet de séquencer en parallèle des amplicons provenant d'échantillons différents et donc de faciliter les répétitions biologiques en intégrant un grand nombre d'échantillons pour une même étude. Cette technique consiste à étiqueter les fragments d'ADN à séquencer par un identifiant moléculaire de quelques bases (Multiplex Identifier, MID) qui est spécifique pour chaque échantillon (Binladen *et al.*, 2007 ; Parameswaran *et al.*, 2007). Cette possibilité de multiplier les échantillons permet l'étude des facteurs qui structurent les communautés de microorganismes sur de grandes échelles spatiales. Le pyroséquençage est ainsi recommandé pour les études de diversité microbienne (Roh *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Les limitations**

L'utilisation du séquençage haut-débit présente toutefois des défis qui restent à relever. Notamment, le barcoding accumule les défauts du code barre proprement dit et les biais liés aux techniques moléculaires (extraction de l'ADN génomique environnemental, amplification PCR et séquençage).

Concernant le code barre, le nombre de copies de la région ITS et le pourcentage de variation nucléotidique n'est pas constant entre phylum (Nilsson *et al.*, 2008 ; Hughes *et al.*, 2009 ; Baldrian *et al.*, 2013). De plus, il existe de l'hétérogénéité entre les copies ITS au sein d'un même individu (Belbahri *et al.*, 2008). L'ITS ne permet pas toujours l'assignation à un groupe taxonomique répertorié et les séquences de groupes taxonomiques peu connus restent relativement peu informatives (Peay *et al.*, 2008 ; Nilsson *et al.*, 2009 ; Nilsson *et al.*, 2012). En réponse, quelques études récentes invitent à considérer une approche phylogénétique à plusieurs loci (Aguileta *et al.*, 2008 ; Gazis *et al.*, 2011 ; Powell *et al.*, 2011 ; Vrålstad, 2011). Concernant les limites techniques, chaque étape introduit un biais plus ou moins maîtrisé. Ainsi l'isolement des molécules d'ADN des échantillons n'offre pas un rendement de 100%, les différents protocoles utilisés n'aboutissent pas à la même image de la communauté pour un même échantillon et un même protocole n'a pas la même efficacité pour des échantillons de nature physico-chimique différents (Martin-Laurent *et al.*, 2001 ; Lakay *et al.*, 2007 ;

Tedersoo *et al.*, 2010a ; Terrat *et al.*, 2012). Ensuite, la PCR est incontournable et très efficace pour l'étude des champignons du sol car le séquençage direct de l'ADN génomique environnemental produit beaucoup plus de données sur les bactéries dont la quantité d'ADN dans un échantillon surpasse celle des champignons après extraction. Toutefois, la réaction PCR peut être limitante et exerce une sélection *a priori* via l'utilisation d'amorces. En effet, la réaction peut ne pas produire les amplicons attendus en quantité suffisante à cause de concentrations trop faibles en ADN matrice et/ou de concentrations trop fortes en molécules inhibitrices telles que les acides humiques (Schneegurt *et al.*, 2003). Des étapes de purifications sont proposées dans la littérature pour améliorer la pureté des extraits (Schneegurt *et al.*, 2003 ; Luis *et al.*, 2004 ; Arbeli & Fuentes, 2007). La réaction PCR est également compétitive (au sens négatif du terme) car les espèces peu abondantes en quantité d'ADN deviennent sous-représentées en « population d'amplicons » après PCR, ce qui exclut une part de la biosphère rare (Gonzalez *et al.*, 2012). Manter *et al.* (2010) ont par ailleurs élégamment montré qu'un mélange précoce d'échantillons (avant extraction ou avant PCR) affecte négativement la richesse fongique et bactérienne suggérant que le regroupement d'échantillons doit préférentiellement avoir lieu après amplification PCR.

Les amorces nucléotidiques exercent également un filtre en restreignant le champ d'investigation de certains clades (Polz & Cavanaugh, 1998 ; Anderson *et al.*, 2003 ; Hong *et al.*, 2009). Par exemple, les amorces sens couramment utilisées telles que ITS1-F, ITS1 et ITS5 sont plus spécifiques des basidiomycètes, alors que les amorces anti-sens telles que ITS2, ITS3 et ITS4 sont plus spécifiques des ascomycètes (Bellemain *et al.*, 2010). De nouvelles amorces, ciblant la région ITS2, ont été décrites pour éviter ces écueils (Ihrmark *et al.*, 2012). Il n'y a pas d'amorces efficaces connues pour cibler l'ITS de l'ensemble des *Phytophthora* et *Pythium*. Historiquement, les méthodes et amorces développées visent la détection des espèces pathogènes en particulier et ne visaient pas à obtenir un inventaire large des *Phytophthora* présents (Cooke *et al.*, 2007 ; Schena *et al.*, 2008). En effet, en phytopathologie, très peu d'études se placent à l'échelle de la communauté. Des travaux proposent par ailleurs des amorces dédiées aux champignons ou aux oomycètes (Martin & Rygielwicz, 2005 ; Scibetta *et al.*, 2012).

Pour réduire les biais lors de la PCR, des études suggèrent d'avoir une forte concentration d'ADN matrice, de limiter le nombre de cycles et de faire des répétitions techniques qui seront mélangées (Polz & Cavanaugh, 1998 ; Kanagawa, 2003). De plus, Berry *et al.* (2011) propose une optimisation simple pour augmenter la reproductibilité des bibliothèques d'amplicons. Il s'agit d'une amplification PCR en deux étapes dont les premiers cycles sont réalisés avec

des amorces non-étiquetées (sans MID, ni adaptateur) et les derniers cycles avec les amorces étiquetées. Cette optimisation évite la ligation de la séquence MID-adaptateur sur des amplicons non-étiquetés après la PCR classique (Berry *et al.*, 2011). Carlsen *et al.* (2012) met également en garde contre le risque d'inversion des MID lors de la préparation de la librairie d'amplicons et préconise l'étiquetage dans les deux sens pour prévenir les erreurs. La préparation de la librairie pour le pyroséquençage est particulièrement délicate car elle repose sur une répartition équimolaire des échantillons. Elle nécessite donc un dosage précis afin d'obtenir une profondeur de séquençage équivalente pour tous les échantillons qui sont à comparer.

Le pyroséquençage 454 en lui-même présente des limites dont les principales sont un taux d'erreur assez élevé de  $10^{-4}$ - $10^{-3}$ , ce qui est plus fort que la méthode traditionnelle (méthode de Sanger) et une longueur limitée des séquences (environ 500pb en 2012). Les erreurs sont en particulier au niveau des régions riches en homopolymères (Huse *et al.*, 2007 ; Kircher & Kelso, 2010 ; Gilles *et al.*, 2011 ; Bik *et al.*, 2012). Les erreurs de pyroséquençage ont pour conséquence une augmentation artificielle de la diversité observée (Kunin *et al.*, 2009 ; Dickie, 2010). Il est cependant difficile de faire la différence entre les erreurs de séquençage et la 'biosphère rare' (Bik *et al.*, 2012). L'élimination des séquences singletons du jeu de données, dont la pratique se généralise, augmente la ressemblance entre répétition technique ce qui suggère que c'est une bonne pratique (Zhou *et al.*, 2011). Ce problème devrait également être minimisé dans le futur puisque les plateformes de séquençage tentent continuellement d'améliorer le taux d'erreur du pyroséquençage et de la technique en général (Shendure & Ji, 2008 ; Kircher & Kelso, 2010 ; Bik *et al.*, 2012 ; Loman *et al.*, 2012). La longueur limitée des séquences ne permet pour l'instant pas d'obtenir des séquences de la longueur de l'ITS complet. Aussi, plusieurs études récentes ont comparé les deux espacements ITS1 et ITS2. Il apparaît que les deux loci mènent à des résultats similaires en termes de communauté, c'est-à-dire que la diversité et la structure de la communauté sont concordantes (Arfi *et al.*, 2012 ; Bazzicalupo *et al.*, 2013 ; Balaalid *et al.*, 2013 ; Monard *et al.*, 2013). Par contre, les espèces les plus abondantes, la composition taxonomique et la richesse estimée (nombre de MOTU) sont différentes entre les deux loci (Bazzicalupo *et al.*, 2013 ; Monard *et al.*, 2013).

De façon spectaculaire, il existe un développement très rapide des outils bioinformatiques et des pratiques qui permettent des correctifs lors du traitement des données (Huse *et al.*, 2010 ; Bik *et al.*, 2012). Il s'agit à la fois d'améliorer la façon de créer les MOTU mais aussi d'améliorer le jeu de séquences de départ. Ainsi, plusieurs algorithmes, dont l'évaluation est

en cours, permettent la création des MOTU (Schloss & Westcott, 2011 ; Bik *et al.*, 2012). De plus, Monard *et al.* (2013) ont par exemple observé de la redondance dans les MOTU pour une longueur minimale de 100 bases par séquence alors qu'ils ne l'ont pas observée pour un seuil de 250 bases. Ce seuil plus contraignant implique toutefois une réduction drastique du nombre de séquences dans le jeu de données et également dans le nombre total de MOTU obtenus. Dans l'étude de Monard *et al.* (2013), la réduction du nombre de séquences est d'un facteur 2,8 pour la région ITS1 et la réduction du nombre de MOTU est d'un facteur 3. Il serait donc possible d'obtenir des regroupements en MOTU plus proches de la notion d'espèces en ne retenant que des séquences de longueur plus élevée.

Par ailleurs, le nombre de séquences obtenues par MOTU ne reflète pas l'abondance naturelle des espèces (Amend *et al.*, 2010 ; Niu *et al.*, 2010). Cela peut s'expliquer, entre autres raisons, par les défauts du code barre (nombre de copies par espèce et par individu non constant) ou par l'amplification préférentielle de certains fragments lors de la PCR par rapport à d'autres (affinité différentielle pour les amorces, forte concentration de certains fragments) (Amend *et al.*, 2010). Amend *et al.* (2010) expriment clairement que l'abondance finale d'une espèce au sein d'un échantillon dépend de la composition globale de l'échantillon, ce qui remet en cause la comparaison des abondances relatives entre différents échantillons. Toutefois, même s'il est reconnu que les approches basées sur le séquençage d'amplicons n'offrent qu'une très faible reproductibilité et ne sont pas adaptées pour une analyse quantitative, celles-ci permettent de discriminer des communautés microbiennes soumises à des traitements différents (Zhou *et al.*, 2011). Afin de mettre en évidence l'effet du facteur, l'augmentation du nombre de répétitions techniques et biologiques ainsi que le séquençage du gène cible dans les deux sens sont de plus en plus préconisés (Zhou *et al.*, 2011 ; Carlsen *et al.*, 2012 ; Knight *et al.*, 2012).

### **3. Distribution et facteurs de structuration des communautés eucaryotes telluriques forestières**

Des centaines d'espèces fongiques sont présentes dans le sol à l'échelle de la parcelle forestière (O'Brien *et al.*, 2005 ; Buée *et al.*, 2009) alors que le nombre d'espèces de *Phytophthora* détectées par parcelle varie généralement entre 3 et 10 (Jung, 2009, Gómez-Aparicio *et al.*, 2012). De ce fait et aussi parce que les oomycètes sont difficiles à détecter, la distribution spatiale, les facteurs de structuration, et plus généralement l'écologie des communautés, sont beaucoup plus documentés pour les champignons que pour les oomycètes (Dahlberg, 2001).



Les communautés microbiennes sont dites structurées car leur distribution spatiale n'est pas homogène (Martiny *et al.*, 2006 ; Peay *et al.*, 2010). Cette structuration spatiale peut refléter un forçage par les contraintes environnementales comme les caractéristiques du sol, mais aussi celles liées à la distribution des espèces de plantes hôtes ou aux activités humaines passées. Elle peut aussi provenir de la dynamique interne de la communauté fongique et refléter les capacités de dispersion des espèces ou bien les relations de compétition/parasitisme entre microorganismes. La compréhension de la structuration des communautés microbiennes nécessite de mettre en évidence les facteurs impliqués qu'ils soient biotiques (principalement liés à la végétation) ou abiotiques (sol ou climat).

### **3.1. Hétérogénéité spatiale et temporelle**

#### **3.1.1. Structure verticale**

Les communautés fongiques sont structurées verticalement dans le profil de sol, c'est-à-dire que tous les champignons ne sont pas présents et uniformément répartis dans les différentes couches pédologiques (Dickie *et al.*, 2002 ; Lindahl *et al.*, 2007 ; Courty *et al.*, 2008 ; Scattolin *et al.*, 2008). Par exemple, les apex mycorhizés par *Piceirhiza stagonopleres*, *Pisolithus tinctorius* et *Hydnum rufescens* ne sont détectés respectivement que dans les horizons OF, A et B (Scattolin *et al.*, 2008). Autre exemple, l'abondance des apex mycorhizés par *Cenococcum geophilum* ou *Amanita muscaria* diminue progressivement avec la profondeur alors qu'elle augmente dans le cas de *Boletus edulis* ou *Cortinarius obtusus* (Scattolin *et al.*, 2008). De plus, les différentes formes du champignon (mycélium, ectomycorhize) ne se situent pas forcément dans le même horizon (Genney *et al.*, 2006). Cette structuration peut s'expliquer par la combinaison d'éléments comme la structure même du sol dont la nature du substrat varie avec la profondeur, et l'utilisation différentielle des ressources par les champignons (Dickie *et al.*, 2002 ; Tedersoo *et al.*, 2003 ; Toljander *et al.*, 2006 ; Lindahl *et al.*, 2007 ; Courty *et al.*, 2008). En effet, Lindahl *et al.* (2007) ont montré que les champignons saprophytes occuperaient préférentiellement la litière la plus récente au niveau de l'horizon de surface alors que les champignons mycorhiziens seraient le groupe écologique dominant les couches sous-jacentes constituées de litière décomposée et d'humus. Sur la base de leurs observations, Dickie *et al.* (2002) suggèrent des espèces spécialistes de la litière (*Tylopilus felleus*, *Ramaria concolor*) ou généralistes (*C. geophilum*, *Clavulina cristata*).

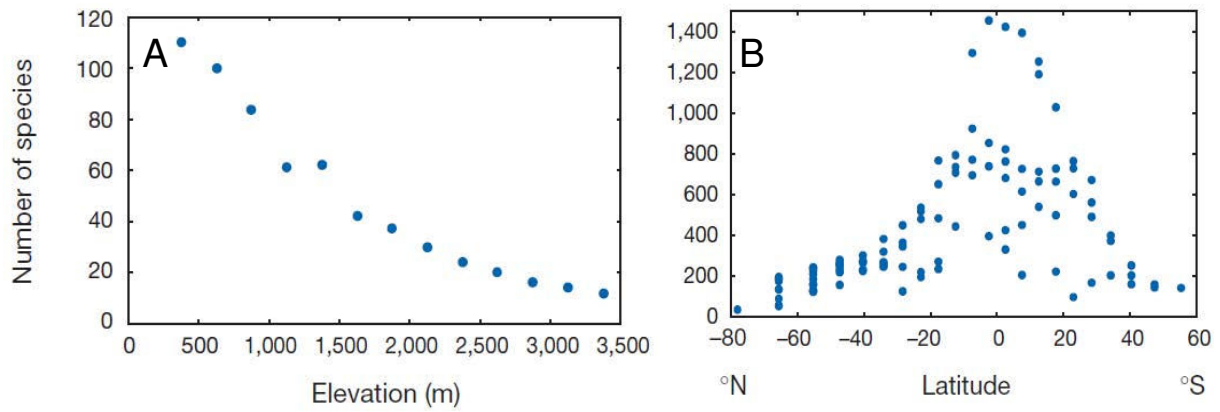
Dans le cas des oomycètes, les éléments d'information sur la distribution verticale proviennent d'études sur la survie dans les différentes couches du sol. Par exemple, Fichtner *et al.* (2007) ont montré une meilleure survie estivale de *P. ramorum*, agent pathogène du chêne, sur des disques infectés et placés à environ 6 cm de profondeur que lorsque les disques sont disposés à l'interface sol/litière ou la surface de la litière. Egalement, les espèces de *Phytophthora* sensibles au gel, comme *P. cinnamomi*, sont inactivées des horizons de surface pendant l'hiver lors des gelées (Benson, 1982). Pour être représentatif, l'échantillonnage doit donc tenir compte de cette structure horizontale et verticale pour dimensionner la taille d'un échantillon et le nombre d'échantillons à prélever sur une parcelle forestière.

### **3.1.2. Structure horizontale**

Les champignons peuvent aussi être structurés spatialement à l'échelle de la parcelle (Pickles *et al.*, 2010). La distance minimale au-delà de laquelle deux communautés de champignons du sol ne sont plus corrélées peut ainsi varier selon les sites de 2,5 à 25m (Lilleskov *et al.*, 2004 ; Izzo *et al.*, 2005). Il a été montré que les espèces mycorhiziennes ont souvent une distribution agrégée avec une taille des agrégats qui peut varier d'une espèce à l'autre (Horton & Bruns, 2001 ; Lilleskov *et al.*, 2004 ; Pickles *et al.*, 2010). Toutefois, les espèces sont majoritairement rares et il est par conséquent difficile de caractériser leur type de répartition (Dahlberg, 2001 ; Izzo *et al.*, 2005). Une structuration spatiale de la distribution des oomycètes à l'échelle de la parcelle a aussi été démontrée (Gómez-Aparicio *et al.*, 2012 ; Hansen & Delatour, 1999).

### **3.1.3. Structure le long de gradients environnementaux**

Les communautés peuvent également être structurées à des échelles spatiales plus importantes comme la région ou le continent. Certains gradients environnementaux sont connus pour structurer fortement les communautés de nombreux organismes tels que les plantes et les animaux. Ainsi, il a été bien montré que la richesse des communautés végétales et animales diminue avec l'augmentation de l'altitude (Rahbek, 1995 ; Gaston, 2000) et dépend de la latitude (Gaston, 2000 ; Hillebrand, 2004) (Figure 9). Plus précisément, la diversité présente une distribution unimodale avec un maximum situé à faible altitude et à l'équateur (Rahbek, 1995 ; Gaston, 2000 ; Rahbek, 2005 ; Nogués-Bravo *et al.*, 2008).



**Figure 9.** Gradients de diversité généralement observés chez les plantes et les animaux le long de gradients géographiques. (A) Richesse en espèces de chauves-souris au Pérou en fonction de l'altitude et (B) richesse en espèces d'oiseaux. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [NATURE] (Gaston, 2000), copyright (2000).

Les données disponibles à ce jour ne permettent pas de déterminer si ce patron général de distribution des communautés s'applique aux communautés fongiques. En effet, les quelques études portant sur les champignons ne présentent pas des conclusions convergentes. Par exemple, Meier *et al.* (2010) et Meng *et al.* (2013) n'ont pas observé de variation de richesse en champignons avec l'altitude. Pour les champignons mycorrhiziens, la plupart des études réalisées montrent que le gradient de diversité observé serait cohérent avec celui observé pour les plantes et animaux, c'est-à-dire une diminution de la diversité avec l'altitude (Kernaghan & Harper, 2001 ; Wu *et al.*, 2007 ; Lugo *et al.*, 2008 ; Bahram *et al.*, 2012). Toutefois, Gómez-Hernández *et al.* (2012) ont décrit une distribution unimodale avec un pic de diversité en champignons ectomycorhiziens à 1500m d'altitude. Cette différence entre la communauté fongique globale et le groupe plus restreint des champignons mycorrhiziens pourrait s'expliquer par le lien plus étroit que ces espèces symbiotiques entretiennent avec leur hôte.

L'existence d'un gradient latitudinal de diversité chez les microorganismes n'est pas non plus clairement établie. Il a notamment été suggéré que le gradient latitudinal de diversité pour les champignons serait inversé par rapport au gradient généralement observé, c'est-à-dire que la richesse serait plus importante en milieu tempéré qu'en milieu tropical (Amend *et al.*, 2010 ; Tedersoo & Nara, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2012). Toutefois, certaines études n'ont pas observé de diminution significative de diversité en champignons ectomycorhiziens avec la latitude (Bjorbaekmo *et al.*, 2010 ; Timling *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la composition des communautés change avec l'altitude et la latitude. Cela a été démontré sur des gradients altitudinaux pour les champignons de la phyllosphère (Cordier *et al.*, 2012a), les champignons mycorrhiziens (Kernaghan & Harper, 2001 ; Bahram *et al.*, 2012 ; Gorzelak *et al.*, 2012 ; Jarvis *et al.*, 2013) et les champignons décomposeurs du bois (Meier *et al.*, 2010). Timling *et al.* (2012) ont rapporté un changement des champignons EcM le long d'un gradient latitudinal couvrant plusieurs zones bioclimatiques dans l'Arctique nord américain et Amend *et al.*, (2010) ont montré que les communautés de champignons présents dans les bâtiments se différencient selon leur origine géographique (milieu tempéré de l'hémisphère nord, milieu tempéré de l'hémisphère sud et région tropicale). A l'inverse, Dennis *et al.*, (2012) n'ont pas observé de modification de composition en champignon du sol le long d'un gradient latitudinal en Antarctique.

Altitude et latitude ne sont toutefois pas en elles-mêmes les variables explicatives intervenant dans les mécanismes responsables de la structure des communautés, ce qui peut expliquer des observations a priori contradictoires. Par contre, ces deux types de gradient reflètent des gradients de conditions environnementales, notamment des gradients climatiques.

Les champignons et oomycètes présentent également une dynamique temporelle à court et long terme. D'une saison à l'autre et d'une année sur l'autre, la présence et l'abondance relative des champignons associés aux racines ne sont pas forcément conservées (Buée *et al.*, 2005 ; Izzo *et al.*, 2005 ; Burke *et al.*, 2009 ; Pickles *et al.*, 2010). La détection des *Phytophthora* est également liée au moment de l'année. Fichtner *et al.* (2007) ont détecté avec succès *P. ramorum* dans le sol lors de la saison hivernale et montré sa persistance jusqu'en juillet voire septembre selon le calendrier des précipitations. Toutefois, tous les *Phytophthora* n'ont pas le même optimum et plusieurs espèces peuvent se succéder au fil des saisons. Camy *et al.* (2003) ont montré une plus forte abondance de *Phytophthora europae* en hiver tandis que *Phytophthora quercina* était plus abondant en été. Sur le plus long terme (plusieurs dizaines d'années), la diversité fongique est affectée par les successions végétales. Elle augmente durant les stades précoces de la succession du fait du recrutement de nouvelles espèces puis diminue avec le vieillissement du peuplement (Last *et al.*, 1987 ; Selosse, 2001). Il se produit ainsi une succession dans les communautés fongiques d'abord dominées par des champignons dits de stade précoce (*Laccaria*, *Hebeloma*, *Inocybe*) puis relayés par des champignons de stade intermédiaire, et enfin tardif (*Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Leccinum*, *Lactarius*, *Russula*) (Guinberteau & Courtecuisse, 1997 ; Selosse, 2001 ; Buée *et al.*, 2011).

### **3.2. Structuration par les facteurs biotiques**

Les communautés fongiques et d'oomycètes présentent des liens très forts et de nature différente avec la végétation. Le type d'essence (conifère ou feuillu), la famille de plante et l'identité des espèces végétales conditionnent en effet la composition de la communauté de champignons. Les communautés fongiques associées à des espèces de plantes phylogénétiquement proches sont plus semblables que celles associées à des plantes phylogénétiquement éloignées (Ferris *et al.*, 2000 ; Ishida *et al.*, 2007 ; Buée *et al.*, 2011 ; Tedersoo *et al.*, 2013). Cela s'explique par la spécificité d'hôte plus ou moins marquée que l'on observe pour de nombreuses espèces de champignon c'est-à-dire que l'association hôte-champignon est observée plus souvent que si elle était due au hasard (Ishida *et al.*, 2007 ; Tedersoo *et al.*, 2008 ; Aponte *et al.*, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2010b ; Buée *et al.*, 2011 ; Rochet *et al.*, 2011). Par exemple, *Lactarius quietus* est un champignon connu pour être à proximité des chênes (Buée *et al.*, 2011). Plus extrême que la simple préférence, la spécialisation d'hôte avec coévolution stricte est possible, comme c'est le cas de l'aulne et des champignons mycorrhiziens qui lui sont associés (Bruns *et al.*, 2002 ; Rochet *et al.*, 2011).

Toutefois, l'hôte ne semble pas aussi prépondérant pour la structuration des communautés ectomycorhizienne en milieu tropical par rapport au milieu tempéré (Tedersoo *et al.*, 2011). Cet effet de l'hôte végétal se retrouve pour d'autres communautés de microorganismes. Ainsi, la répartition des hôtes explique la distribution des champignons à arbuscules à différentes échelles spatiales (Yang *et al.*, 2012). L'hypothèse de la structuration des communautés d'oomycètes par l'hôte végétal est avancée par Arcate *et al.* (2006) sans pouvoir être démontrée du fait d'un facteur confondant.

La diversité végétale spécifique ou génétique influence également la diversité microbienne. Par exemple, Ferris *et al.* (2000) observent une relation significativement positive entre la richesse en essences forestières et la richesse en champignons ectomycorhiziens. Il semble que la diversité spécifique végétale conditionne la communauté microbienne par des effets directs *via* la composition de la litière ou indirects *via* la qualité chimique du sol (Aponte *et al.*, 2010 ; Thoms *et al.*, 2010). Par contre, Johnson *et al.* (2010) montrent dans des expériences en mésocosmes qu'une plus grande diversité génétique par espèce végétale s'accompagne d'une plus faible diversité de champignons associés aux racines.

D'autres caractéristiques du peuplement telles que sa densité, la fermeture du couvert végétal et la productivité, influencent également les communautés mycorhiziennes (voir la revue de Johnson *et al.*, 2005 ; Twieg *et al.*, 2007 ; Druebert *et al.*, 2009 ; Wallander *et al.*, 2010) et les communautés de champignons parasites (Vacher *et al.*, 2008). Gómez-Aparicio *et al.* (2012) suggèrent que l'abondance de *Pythium* et *Phytophthora cinnamomi* serait liée au voisinage végétal, notamment l'identité, la densité et la hauteur des espèces d'arbres présentes. Malheureusement, l'état sanitaire du feuillage, facile à observer, ne serait pas un bon indicateur de présence de *Phytophthora* (Camy *et al.*, 2003 ; Balci *et al.*, 2007).

Les interactions, positives ou négatives, entre les différentes espèces et les besoins convergents ou divergents en ressources sont aussi des processus qui peuvent participer à la structuration des communautés à l'échelle locale (Lilleskov *et al.*, 2004) ou régionale (Defosse *et al.*, 2011). Par exemple, la distribution spatiale et temporelle du système racinaire (*via* le renouvellement du système) participent également à la structure des communautés fongiques, tout particulièrement dans le cas des communautés mycorhiziennes qui sont dans une relation symbiotique (Izzo *et al.*, 2005 ; Pickles *et al.*, 2010).

De manière générale, les pratiques sylvicoles ou culturales et les perturbations de manière générale qui forment l'historique d'une parcelle déterminent la composition des communautés de microorganismes (Buée *et al.*, 2005). Ainsi, les activités humaines influencent de manière indirecte la structuration des communautés microbiennes *via* la détermination de la végétation

(choix des essences) et l'altération des facteurs précités liés à la végétation (éclaircies, coupes).

### 3.3. Structuration par les facteurs édaphiques

Par ailleurs, les communautés microbiennes sont aussi sous l'influence du milieu dans lequel elles évoluent. C'est la raison pour laquelle les facteurs édaphiques jouent sur la diversité et la structure des communautés microbiennes.

Le pH est une caractéristique principale du sol qui peut affecter les communautés de microorganismes. Ainsi, Bååth & Anderson (2003) montrent que l'abondance fongique par rapport aux bactéries diminue quand le pH augmente. L'impact du pH du sol sur les communautés de champignons diffère toutefois assez fortement selon les études. Thoms *et al.* (2010) n'ont pas trouvé de corrélation entre le pH et l'abondance des champignons, que l'on prenne en compte tous les taxons ou seulement les champignons mycorhiziens à arbuscules. Par contre, Rousk *et al.* (2010) mettent en évidence une relation significative entre pH et abondance relative de certains groupes d'ascomycètes : cette relation est positive dans le cas des Hypocréales alors qu'elle est négative dans le cas des Hélotiales. Ferris *et al.* (2000) ont montré que la relation entre richesse des communautés de champignons et pH du sol dépendait du groupe considéré, avec une corrélation négative dans le cas des saprophytes, positive pour les espèces parasites et une absence de corrélation pour les espèces mycorhiziennes. Cette absence de relation significative entre pH du sol et richesse mycorhizienne est confirmée par Rousk *et al.* (2010). De plus, Wubet *et al.* (2012) montrent que le pH est un des facteurs les plus importants contrôlant la composition des communautés fongiques et celles des champignons ectomycorhiziens en hêtraie. Concernant les oomycètes, *Phytophthora* a été détecté dans une large gamme de pH (entre 3 et 7) (Jung *et al.*, 2000 ; Jung, 2009). Toutefois, les sols acides seraient peu favorables aux *Phytophthora* car ils sont détectés à faible fréquence lorsque le pH est inférieur à 4 (Delatour, 2001). Vettraino *et al.* (2002) ont confirmé que la fréquence d'isolement des *Phytophthora* et le pH du sol étaient corrélés positivement. Ainsi, il semblerait que l'effet du pH du sol sur l'abondance et la diversité des champignons soit dépendant du groupe fonctionnel et de la famille.

Fortement lié au pH du sol, la qualité de la litière peut également affecter les communautés microbiennes. La diversité fongique augmente avec la vitesse de décomposition de la litière (Rajala *et al.*, 2012).

De nombreuses études concluent à une relation entre teneur en azote du sol et communautés de champignons (voir la récente revue de Lilleskov *et al.*, 2011 ; Jarvis *et al.*, 2013). Une méta-analyse montre ainsi que l'abondance des mycorhizes diminue lors de traitement fertilisant azoté (Treseder, 2004). De plus, la richesse taxonomique fongique diminue avec l'augmentation des dépôts atmosphériques d'azote et avec la disponibilité en azote ce qui induit sur le long terme un changement de la composition des communautés fongiques (Lilleskov *et al.*, 2002 ; Buée *et al.*, 2011 ; Lilleskov *et al.*, 2011). D'autre part, la distribution verticale de la communauté fongique dans le profil de sol serait liée aux activités de mobilisation de l'azote par les champignons mycorhiziens (Lindahl *et al.*, 2007).

De même que pour l'azote, Treseder (2004) montre que la teneur en phosphore du sol réduit l'abondance des champignons mycorhiziens en cas de fertilisation phosphorée. Twieg *et al.* (2009) montrent un effet négatif du phosphore disponible sur la richesse en champignons ectomycorhiziens en forêt de douglas mais cet effet n'est pas observé en forêt de bouleaux. Egalement, Burke *et al.* (2009) rapportent un effet négatif du phosphore inorganique sur la richesse des communautés de champignons en forêt mixte hêtraie-érablaie. Ils rapportent également un effet du phosphore organique sur la structure de la communauté qui dépend de la saison, étant observable en septembre mais pas en juin.

La texture du sol peut influencer les communautés microbiennes. Cette caractéristique du sol reflète la proportion des particules de différente taille (argile, limon, sable). La quantité de sable est un facteur expliquant une grande partie de la variation liée à la composition des communautés fongiques et ectomycorhizienne (Wubet *et al.*, 2012). Ceci est aussi observé pour les oomycètes du genre *Phytophthora* qui ne semblent pas dépendre du substrat géologique ou du type de sol mais de la texture de sol. En effet, *Phytophthora* est détecté dans une large gamme de conditions en chênaie ou en hêtraie (Jung *et al.*, 2000 ; Vettraino *et al.*, 2002 ; Jung, 2009). Toutefois, Jung *et al.* (2000) n'ont pas détecté d'espèces du genre dans les sols à forte teneur en sable et Gómez-Aparicio *et al.* (2012) ont modélisé un effet négatif de la quantité de sable sur l'abondance de *P. cinnamomi* et de deux espèces de *Pythium*.

Le mode d'utilisation, passé et présent, des sols sont des facteurs importants de structuration des communautés microbiennes qui est souvent négligé (Green *et al.*, 2004 ; Van der Gast *et al.*, 2012). En effet, des pratiques agricoles ancestrales peuvent modifier la structure des communautés fongiques (Diedhiou *et al.*, 2009). Egalement, le chaulage, qui est une pratique consistant à ajouter du calcium et du magnésium au sol afin de restaurer les forêts dépérissantes, peut modifier la répartition verticale de la communauté ectomycorhizienne dans le profil de sol (Rineau & Garbaye, 2009).



### 3.4. Structuration par les facteurs climatiques

Comme cela a déjà été évoqué en référence aux gradient géographiques ou aux alternances saisonnières, les variables environnementales liées à l'énergie (température et potentiel d'évapotranspiration annuel) et les variables liées à la ressource en eau (précipitations) ont été identifiées comme les principales variables explicatives régissant la richesse en espèces de nombreux organismes des milieux terrestres tels que les plantes et les animaux (Hawkins *et al.*, 2003). Ces facteurs expliquent généralement la relation entre latitude ou altitude et richesse en espèces. Quelques travaux montrent que les variables climatiques jouent un rôle dans la diversité et la distribution des microorganismes fongiques.

La température est un facteur important pour expliquer les patrons de distribution de nombreux groupes de champignons tels que les champignons parasites des végétaux (Vacher *et al.*, 2008), les champignons macroscopiques (Wollan *et al.*, 2008) ou les champignons mycorhiziens (Tedersoo & Nara, 2010 ; Bahram *et al.*, 2012 ; Tedersoo *et al.*, 2012 ; Timling *et al.*, 2012). Plusieurs études montrent une augmentation de l'abondance des champignons sous l'effet d'un réchauffement artificiel (Rygiewicz *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Clemmensen *et al.*, 2006 ; Meier *et al.*, 2010 ; Castro *et al.*, 2010 ; Deslippe *et al.*, 2011) mais ces effets s'expliqueraient plutôt par les effets indirects du réchauffement via les plantes et les conditions du sol (Staddon *et al.*, 2002 ; Deslippe *et al.*, 2011 ; Schindlbacher *et al.*, 2011). Toutefois, l'effet sur l'abondance n'est pas homogène pour toutes les espèces et un réchauffement pourrait favoriser l'augmentation en biomasse des champignons à forte capacité protéolytique (Deslippe *et al.*, 2011). Ceci pourrait expliquer les résultats concernant la richesse fongique qui diffèrent selon les études : Talley *et al.* (2002) trouvent une relation négative entre richesse fongique et température alors que Deslippe *et al.* (2011) montrent une relation positive. En effet, ces deux études ne s'intéressent ni aux mêmes habitats, ni aux mêmes communautés ; Talley *et al.* (2002) étudient les champignons de l'air et du phylloplan tandis que Deslippe *et al.* (2011) ciblent les champignons ectomycorhiziens. L'effet de la température sur la diversité n'a pas encore été étudié assez extensivement pour être bien connu et pour dégager une tendance générale et comprendre quelles peuvent être les particularités des différents groupes.

Les variables liées à la disponibilité en eau sont également prépondérantes pour expliquer la répartition des espèces. La biomasse fongique semble liée positivement au volume des précipitations estivales (Hawkes *et al.*, 2011) mais la réponse varie selon les espèces. Par

exemple, en condition de sécheresse, l'abondance de *Lactarius subdulcis* et *Byssocorticium atrovirens* ne varie pas alors que celle de *Xerocomus chrysenteron* peut augmenter (Shi *et al.*, 2002). Le champignon ubiquiste *C. geophilum* est quant à lui très résistant au manque d'eau (Pigott, 1982). Une étude très récente montre une corrélation positive entre la diversité fongique et les précipitations (McGuire *et al.*, 2012). Néanmoins, cette conclusion s'applique aux champignons du sol mais pas aux champignons de la litière (McGuire *et al.*, 2012). A l'inverse, Pöhlme *et al.*, (2013) ont montré une corrélation négative entre la richesse ectomycorhizienne et les précipitations. Ces résultats suggèrent de nouveau que l'effet de la quantité de précipitations dépend des communautés fongiques et que le groupe particulier des champignons symbiotiques pourrait répondre différemment aux contraintes. Les précipitations et l'humidité du sol sont des variables fortement liées à la composition de la communauté fongique et ectomycorhizienne (Castro *et al.*, 2010 ; Jarvis *et al.*, 2013). En milieu cultivé, les actions anthropiques sur les régimes hydriques (irrigation, drainage) seraient plus importantes que l'effet des précipitations sur les communautés fongiques (Drenovsky *et al.*, 2010). L'effet des variables climatiques telles que la température et les précipitations sur les communautés microbiennes est encore insuffisamment connu, en grande partie parce que les études à large échelle spatiale permettant d'explorer ces questions étaient difficilement réalisables avec les techniques disponibles il y a quelques années.

## DEMARCHE EXPERIMENTALE

Pour l'aspect méthodologique, il s'agissait de définir l'échelle spatiale et le plan d'échantillonnage les plus appropriés mais également d'éprouver l'application des nouvelles technologies de séquençage sur de larges échantillonnages.

Les aspects d'écologie impliquent dans un premier temps une entreprise d'inventaire des espèces, c'est à dire une évaluation de la richesse à différentes échelles spatiales (de la parcelle au continent). Cet inventaire est tout à fait novateur dans le cas des oomycètes et pourrait servir de base à l'estimation du réservoir d'agents pathogènes dans les sols qui seraient susceptibles d'occasionner des dégâts si les conditions environnementales deviennent favorables. Il s'agit, dans un deuxième temps, d'explorer i) la distribution spatiale des communautés microbiennes telluriques et ii) les facteurs liés à la structure de ces communautés.

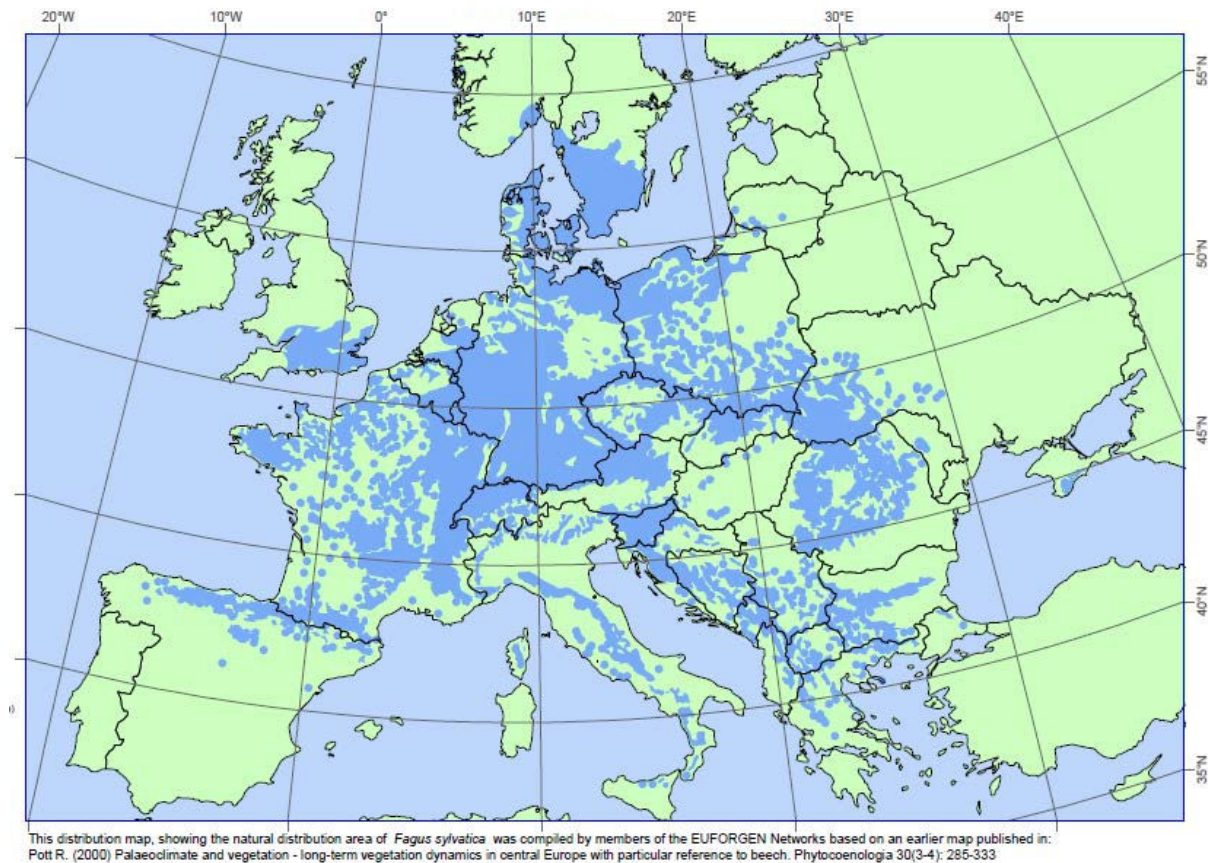
Ces informations sont nécessaires pour décrire les mécanismes déterminants la structure des communautés et peuvent fournir des éléments d'information sur la réponse des microorganismes aux changements environnementaux, en particulier les facteurs climatiques tels que les changements de température. De telles connaissances peuvent ainsi alimenter d'autres recherches fondamentales, par exemple sur les processus de maintien de la diversité, mais soutiennent aussi des approches plus appliquées telles que la conservation des ressources biologiques et la gestion durable des écosystèmes forestiers, qui sont notamment des objectifs du département EFPA.

Les facteurs testés pour leur relation avec la diversité et la structure de ces communautés sont : les facteurs climatiques (température et précipitations) et édaphiques (pH, teneurs en carbone, azote et phosphore). Pour étudier l'effet des facteurs climatiques, l'échelle continentale est appropriée (Wiens, 1989) et les gradients géographiques naturels européens sont utilisés comme analogues spatiaux des changements climatiques et édaphiques (Körner, 2007).

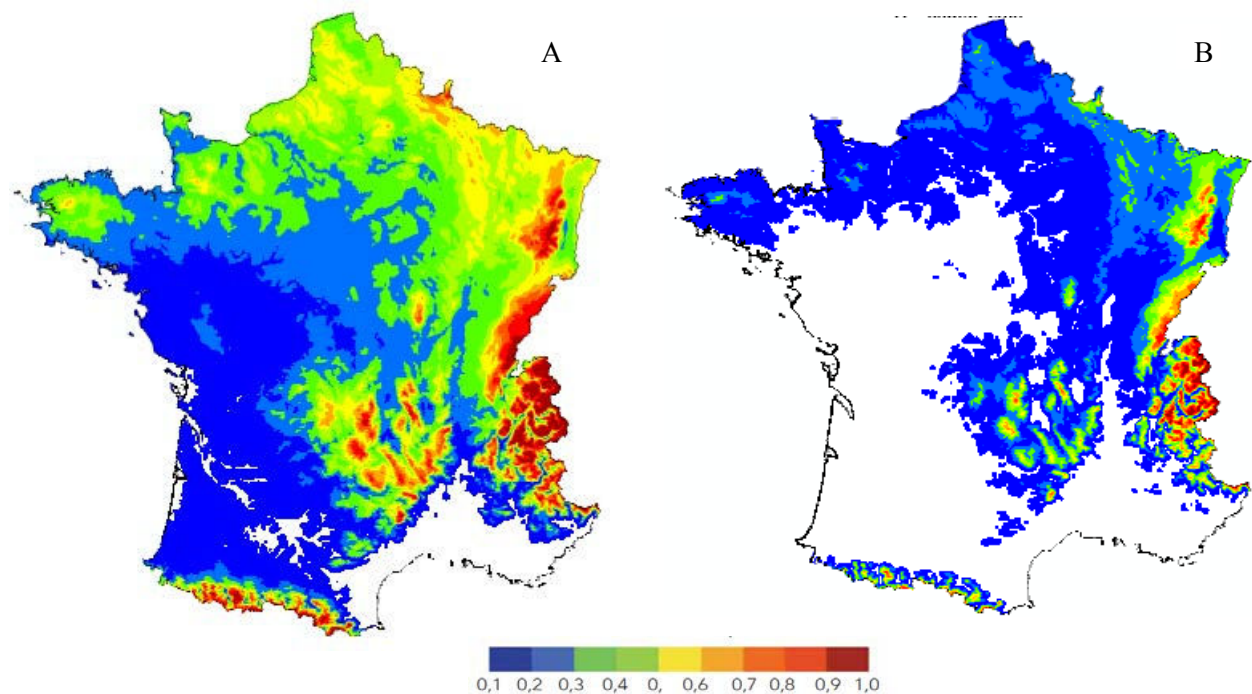
Ces gradients pédoclimatiques intégrés dans le temps permettent d'étudier la réponse sur le long terme des communautés aux variables environnementales. Plusieurs gradients d'altitude ont donc été sélectionnés, ainsi qu'un gradient latitudinal.

Une attention particulière a été accordée aux communautés ectomycorhiziennes. Aussi, afin de s'affranchir de l'effet de l'hôte, une seule essence forestière a été sélectionnée. Comme la majorité des essences forestières tempérées, le hêtre (*Fagus sylvatica* L.) est en interaction avec des champignons ectomycorhiziens et est sensible à certains microorganismes pathogènes, dont les *Phytophthora*, qui peuvent engendrer des dégâts phytosanitaires importants (chancre, fonte des semis) (Jung *et al.*, 2009). Le hêtre est une espèce subocéanique dont l'aire de répartition s'étend entre Madrid et Stockholm (Bolte *et al.*, 2007 ; Figure 10) et il se localise en basse et haute altitude. A l'échelle nationale, c'est la quatrième essence pour ce qui est de la superficie (1 395.103 ha, derrière les chênes), et la troisième pour ce qui est du volume (10,6 %) dans les forêts de production française (source IFN pour la France métropolitaine, résultats produits à partir des données cumulées des campagnes d'inventaire de 2007 à 2011). Même si le hêtre est sensible aux déficits hydriques de la période estivale (Badeau *et al.*, 2007), c'est une espèce tolérant une grande gamme de conditions, ce qui lui confère une compétitivité par rapport à d'autres essences dans le scénario du changement climatique. Toutefois, selon un scénario moyen de changement climatique, l'aire climatique potentielle du hêtre en France se restreindrait au quart Nord-Est et aux régions montagnardes à l'horizon 2100 (Figure 11; Badeau *et al.*, 2004). En conclusion, le hêtre présente des intérêts écologiques et économiques considérables et se prête bien aux études envisagées le long de gradients géographiques et pédoclimatiques.

Le chêne (*Quercus* sp.) ou le pin (*Pinus* sp.) sont également de bons candidats. Notamment, les communautés ectomycorhiziennes associées au pin sylvestre ont par ailleurs été étudiées par Ana María Rincón Herranz dans le cadre du projet BACCARA.



**Figure 10.** Aire de répartition du hêtre. Source : EUFORGEN, 2009, [www.euforgen.fr](http://www.euforgen.fr)



**Figure 11.** Modélisation de l'aire climatique de répartition du hêtre en France. Aire climatique actuelle (A) et aire climatique potentielle à l'horizon 2100 (B) selon les prévisions météorologiques du scénario ARPEGE. Le gradient de couleur représente la probabilité de présence. D'après Badeau *et al.* (2004).

Les trois chapitres du manuscrit relatent les principaux résultats de trois études d'écologie microbienne. Une première étude pilote à l'échelle de la parcelle a été suivie de deux études à grande échelle spatiale le long de gradients environnementaux, l'une suivant trois gradients d'altitude et la dernière le long d'un gradient latitudinal en Europe (Tableau 1). L'étude régionale le long de gradients d'altitude a été permise grâce à Tristan Cordier, Corinne Vacher, Cécile Robin et Marie-Laure Desprez-Loustau de l'UMR Biodiversité, Gènes et Communautés, INRA Bordeaux ; Emmanuel Defosse et Georges Kunstler de l'UR Ecosystèmes Montagnards, IRSTEA, Grenoble ; ainsi que Marianna Stradaioli et Ana-Maria Vettraino du Department of Plant Protection, University of Tuscia, Viterbo, Italie.

Pour l'étude continentale sur gradient latitudinal, des collaborations ont été réalisées avec l'UMR BioGeCo précitée; Ana María Rincón Herranz du Department of Plant Physiology and Ecology, Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Madrid, Espagne ; Marianna Stradaioli et Ana-Maria Vettraino, précitées ; Anna Zolciak du Forest Research Institute, Raszyn, Pologne ; Johanna Boberg, Jan Stenlid, Juan Carlos Santos-Gonzalez et Roger Finlay du Department of Forest Mycology and Pathology, Uppsala.

Le pyroséquençage et la soumission des séquences en ligne a été pris en charge par le Génoscope, dans le cadre du projet AP09/10 - #42 "Forest microorganism diversity on climatic gradient".

**Tableau 1.** Comparaison des caractéristiques générales des trois études.

	<b>Pilote</b>	<b>Altitude</b>	<b>Latitude</b>
<b>Echelle</b>	parcelle	régionale	continentale
<b>Nombre de sites</b>	1	11 (+ 4 italiens)	31
<b>Latitude</b>	48°07'	42°53' - 48°07'	42°52' - 59°35'
<b>Température moyenne annuelle (°C)</b>	9.1	7.3-13.1	6.3-13.8
<b>Précipitations annuelles (mm)</b>	980	920-1700	453-629
<b>pH</b>	4.0-4.3	4.0-6.4	3.9-7.1
<b>Carbone (g.kg-1)</b>	26.4 - 59.8	20.6-117	15.8 - 208.0
<b>Azote (g.kg-1)</b>	1.3 - 2.6	1.2 - 7.8	0.6 - 10.1
<b>Phosphore (g.kg-1)</b>	0.08 - 0.10	0.05-0.34	0.04- 0.58
<b>Nombre d'arbres/site</b>	20	15	15
<b>Nature des échantillons pour Fonges</b>	racines	racines	sol
<b>Profondeur des carottes pour Fonges (cm)</b>	0-10 + 10-20	0-10	0-20
<b>Nature des échantillons pour Pythiacées</b>	sol	sol	sol
<b>Profondeur des carottes pour Pythiacées (cm)</b>	0-10 + 10-20	20-10	0-20

# CHAPITRE I. ETUDE PILOTE A L'ECHELLE LOCALE D'UNE PARCELLE

## 1. Problématique

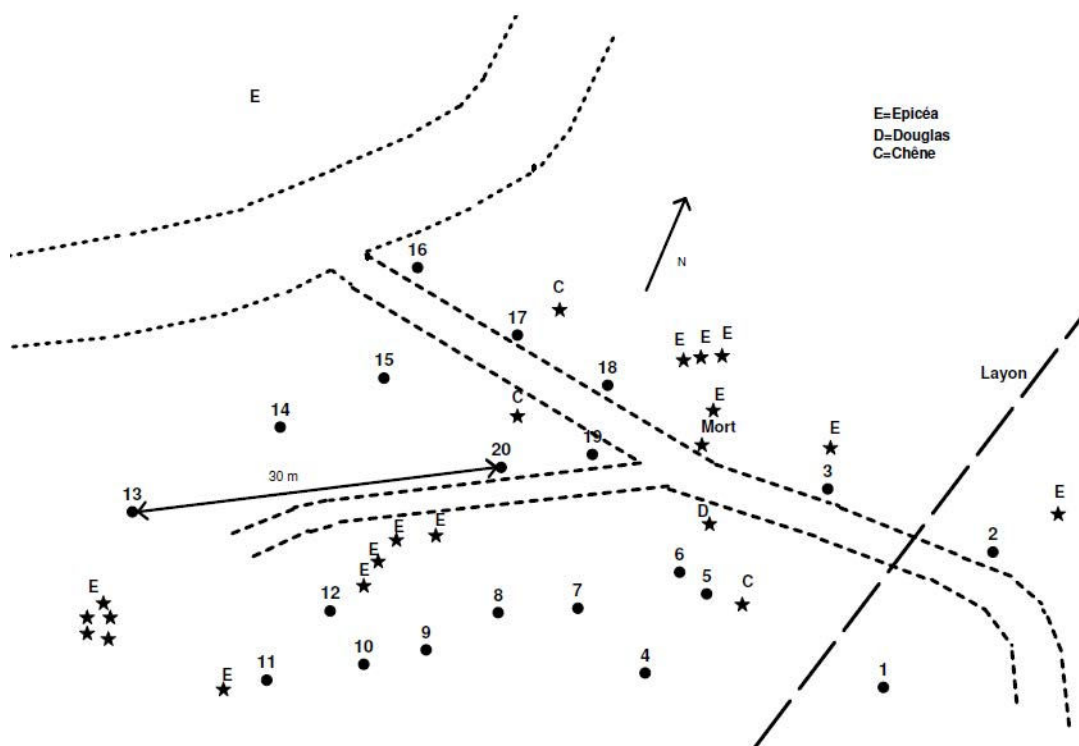
En milieu forestier, la complexité physique, chimique et biologique des sols élèvent au rang de défi l'étude de la diversité des champignons et oomycètes du sol. Cependant, le développement des technologies moléculaires à haut débit, et plus particulièrement du séquençage haut débit, offre un nouvel éclairage sur les possibilités de cataloguer ces microeucaryotes. C'est aussi la possibilité d'envisager un changement d'échelle (multi-sites) et une gestion plus massive des échantillons environnementaux, imposée par l'hétérogénéité souterraine des milieux étudiés.

Pour préparer ces études multi-sites, une expérience préliminaire a été réalisée avec plusieurs objectifs. Il s'agissait de i) évaluer la pertinence d'une stratégie d'échantillonnage, en terme de richesse spécifique obtenue au sein d'une parcelle donnée, ii) étudier la distribution spatiale (diversité verticale dans le profil de sol et hétérogénéité au sein du site) des organismes fongiques et oomycètes, iii) apprécier la compartimentation des espèces fongiques, en particulier des EcM selon les matrices étudiées (racines vs sol), iv) appliquer les techniques de biologie moléculaire et le séquençage haut-débit sur les communautés d'oomycètes du sol forestier et v) éprouver les outils bioinformatiques et statistiques pour l'analyse de données.

## 2. Méthodologie

Vingt hêtres contigus (25 m de distance environ) et répartis de façon homogène sur la parcelle ont été choisis en forêt de Lignéville (Vosges) (Figure 12). Quatre prélèvements (carottes de sol) par arbre ont été échantillonnés mi-décembre 2009 et des couples d'amorces différents ont été utilisés pour cibler les champignons et les oomycètes (Figure 13 ; Tableau 1).





**Figure 12.** Plan du site de Lignéville (Vosges). Localisation des vingt hêtres autour desquels quatre carottes de sol ont été échantillonnées en Décembre 2009.

	Racines	Sol	
Horizon organique	RS (n=20)	SS (n=20)	Champignons (ITS1F-ITS2)
Horizon organo-minéral	RI (n=20)	SI (n=20)	Oomycètes (ITS6-ITS7)

**Figure 13.** Etude des communautés fongiques et oomycètes dans quatre compartiments distincts.  
 SS : sol supérieur, RS: racines supérieur, SI : sol inférieur, RI: racines inférieur.

### 3. Résultats

Les résultats de ces expériences ont tout d'abord confirmé la grande diversité fongique des sols forestiers observée par Buée *et al.* (2009), mais aussi révélé les difficultés de détection des oomycètes pathogènes. Quelques *Phytophthora* et *Pythium* ont été identifiés à une faible fréquence alors que plus de 2000 MOTU fongiques ont été comptabilisées dans un mélange total de 2 g de racines séchées et 20 g de sol humide. Une certaine redondance dans les communautés associées à chaque arbre suggère qu'il n'est pas nécessaire d'échantillonner auprès de tous les arbres présents pour estimer la richesse à l'échelle de la parcelle. Toutefois, cela implique de décrire chaque échantillon avec une profondeur de séquençage conséquente. Dans cette étude, un compromis entre une quinzaine d'arbres et 10 500 séquences par arbre permet d'accéder à 90% de la richesse totale estimée. De manière intéressante, les communautés fongiques décrites dans l'habitat 'sol' correspondent fortement aux communautés fongiques décrites dans l'habitat 'racines'. Ainsi, cela suggère que le sol, plus facilement exploitable que le système racinaire en écologie moléculaire, pourrait être directement utilisé pour étudier la composition des communautés fongiques racinaires.

La communauté fongique sur la parcelle était structurée verticalement dans le profil de sol et horizontalement. De multiples variables confondantes (masse racinaire, pH, C, N) différencient les deux horizons verticaux étudiés et il n'a donc pas été possible d'imputer la structure verticale de la communauté à une ou plusieurs variables en particulier. Par contre, le ratio C:N et le phosphore participent à la structure horizontale de la communauté fongique.

Cette structuration en deux dimensions suggère deux éléments pour décrire la communauté fongique d'une parcelle. D'une part, les arbres sélectionnés devraient être répartis sur la parcelle afin de tenir compte de son hétérogénéité et d'autre part, les différents horizons pédologiques devraient être idéalement considérés. Les résultats de l'étude sont publiés sous la forme d'un article scientifique.

Reprinted from Fungal Ecology, Vol 6, Aurore Coince, Olivier Caël, Cyrille Bach, Juliette Lengellé, Corinne Cruaud, Frédéric Gavory, Emmanuelle Morin, Claude Murat, Benoît Marçais, Marc Buée, **Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest**, Pages 223-235, Copyright (2013), with permission from Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/funeco](http://www.elsevier.com/locate/funeco)

## Below-ground fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete communities in a French beech forest

Aurore COINCE<sup>a</sup>, Olivier CAËL<sup>a</sup>, Cyrille BACH<sup>a</sup>, Juliette LENGELLÉ<sup>a</sup>, Corinne CRUAUD<sup>b</sup>,  
Frédéric GAVORY<sup>b</sup>, Emmanuelle MORIN<sup>a</sup>, Claude MURAT<sup>a</sup>, Benoît MARÇAIS<sup>a,1</sup>,  
Marc BUÉE<sup>a,\*,1</sup>

<sup>a</sup>INRA, UMR1136 INRA Université de Lorraine “Interactions Arbres/Micro-organismes”, IFR110 EFABA, Centre INRA de Nancy, Route d’Amanche, 54280 Champenoux, France

<sup>b</sup>CEA-Institut de Génomique, Génomscope, Centre National de Séquençage, 2 rue Gaston Crémieux, CP 5706, 91057 Evry cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 September 2012

Revision received 12 December 2012

Accepted 14 December 2012

Available online 28 March 2013

Corresponding editor: John Dighton

#### Keywords:

Diversity

Ectomycorrhizal fungi

*Fagus sylvatica*

Fine roots

Oomycete

Phytophthora

Pyrosequencing

Soil

Spatial distribution

### ABSTRACT

The use of next-generation DNA sequencing methods, which produce massive volumes of data, has transformed fungal molecular ecology. These technologies offer the opportunity to describe microbial communities in depth and to investigate fungal diversity at a large geographical scale. In particular, due to the emergence of studies conducted at a large scale (countries, continents), the definition of a compromise between the optimal and representative description of local diversity (plot scale) and the management of a greater number of sites for these studies is required. This work was performed to explore the local richness and the structure of the ectomycorrhizal (EcM) fungal and oomycete communities in a temperate beech plot using 454 pyrosequencing technology. The internal transcribed spacer 1 (ITS1) region was amplified and sequenced from fine roots and soil sampled from the two upper horizons. Our analyses suggest that soil could be a good substitute for fine roots in studying EcM fungi. The fungal assemblage exhibited a vertical distribution in the soil profile. Only four Pythiaceae were identified, which was insufficient to study the spatial distribution of this group. The fungal and particularly the ectomycorrhizal (EcM) richness was not correlated with any soil variable (pH, C, N or P), but the spatial structure was explained by the C:N ratio and phosphorus content. Our data reveal the importance of maintaining a minimal representative sampling at the plot scale for comparative geographical studies.

© 2013 Elsevier Ltd and The British Mycological Society. All rights reserved.

### Introduction

Soil microorganisms are important components of forest ecosystems and can be intimately linked with forest trees through symbiotic, mutualistic or pathogenic interactions.

Fungal microorganisms such as saprotrophic or mycorrhizal fungi are involved in important functions within the soil in relation to nutrient cycling (Smith & Read 2008; Courty *et al.* 2010), water dynamics and disease control that are essential for the health and growth of forest trees. In contrast, some soil

\* Corresponding author. Tel.: +33 383 39 40 72; fax: +33 383 39 40 69.

E-mail address: [buee@nancy.inra.fr](mailto:buee@nancy.inra.fr) (M. Buée).

<sup>1</sup> Authors who equally lead the work.

microorganisms are pathogens, such as *Phytophthora* species belonging to the Pythiaceae (Stramenopiles kingdom). These species are involved in forest declines and dieback (Erwin & Ribeiro 1996), participating in tree selection and causing important economic losses. In general, soil microorganisms are highly diverse and are not randomly distributed at broad or local scales (Green et al. 2004). However, compared to plants and animals, little is known about the community structure and spatial distribution of microorganisms, mainly due to technological limitations. Indeed, morphological-based methods, such as fungal sporocarp monitoring (Buée et al. 2011), root-tip morphotype inventories (Tedersoo et al. 2003) and oomycete spore baiting (Hansen & Delatour 1999; Fichtner et al. 2007), require considerable expertise and time. Additionally, these methods may not be exhaustive, which could explain the relative underestimation of some microbial communities (Hibbett et al. 2011). This is particularly the case for Pythiaceae, which are important soil pathogens (Erwin & Ribeiro 1996; Hansen & Delatour 1999; Brasier 2009).

New sequencing techniques, such as high-throughput pyrosequencing (Margulies et al. 2005), provide a great opportunity to further investigate microbial communities at different scales. Recently, numerous studies have employed 454 sequencing to highlight the extraordinary fungal diversity in soil or on plant roots, including that of ectomycorrhizal (EcM) fungi, which are found in the vicinity of tree roots (Öpik et al. 2009; Buée et al. 2009; Tedersoo et al. 2011; Jumpponen et al. 2010; Wallander et al. 2010; Kausarud et al. 2012). High-throughput sequencing represents an excellent tool for describing soil fungal communities and characterising their structure on a larger scale because it provides the opportunity to increase the number of samples and to deepen investigation within samples (O'Brien et al. 2005; Uroz et al. 2010). However, pathogenic species belonging to the *Pythium* or *Phytophthora* genera are widespread and play important roles in natural ecosystems, but the available molecular methods for characterising their communities from environmental samples have been poorly assessed (Arcate et al. 2006; Cooke et al. 2007). A recent study reported the development of a molecular approach to detect *Phytophthora* species from soil samples using novel sets of genus-specific primers designed against internal transcribed spacer (ITS) regions. However, attempts to detect *Phytophthora* species in numerous environmental samples remain unsuccessful (Scibetta et al. 2012). Moreover, oomycetes have not been well studied at the community level compared with fungi or bacteria (Rousk et al. 2010). Although baiting methods have provided some insight into the diversity of the *Phytophthora* communities in natural ecosystems, these techniques require a long time to implement, which strongly limits the ability to describe these communities (Hansen & Delatour 1999; Jung et al. 2000; Cooke et al. 2007; Balci et al. 2007). As a consequence, few studies have explored the distribution of the oomycete community in forest soils at the stand scale (Hansen & Delatour 1999; Gómez-Aparicio et al. 2012), and none of these investigations has used next-generation sequencing.

At a local scale, EcM fungi may exhibit a discrete or extended patch distribution (Pickles et al. 2010). The relative spatial distributions of sporocarps and fungal mycelia are known to differ significantly, and has been particularly well

studied among EcM fungi (Jansen & de Nie 1988; Peter et al. 2001). It is also reported that locally, the spatial distribution of EcM hyphae does not follow that of their mycorrhizas (Van Der Linde et al. 2009) and that the relative abundance of mycorrhizas and mycelia differs between fungal species (Kjøller 2006). There is also evidence that the mycelium and mycorrhiza of the same species are segregated vertically throughout the soil layers (Genney et al. 2006). In boreal forests, fungi are distributed in the vertical soil profile, with saprobes dominating in the litter, and mycorrhizal fungi showing abundance in the humus layer (Lindahl et al. 2007).

Several factors may explain this heterogeneous spatial distribution of microorganisms, but such environmental factors are still poorly understood (Rousk et al. 2010). Ascomycetes have been suggested to respond to soil chemistry, water and resource concentrations at small scales, rather than to the type of land (Green & Bohannan 2006). Soil pathogens exhibit a spatial pattern that depends on the vegetation present and soil characteristics. For example, the soil water regime and soil texture, i.e., the proportion of sand, are major factors impacting the distributions of *Phytophthora* and *Pythium* species (Hansen & Delatour 1999; Jung et al. 2000; Gómez-Aparicio et al. 2012). However, the perception of the fungal community structure is largely dependent on the sampling effort and strategy applied, and characterisation of spatial patterns has proved to be difficult with small size samples (Whitcomb & Stutz 2007). Indeed, undersampling has been stressed as biasing conclusions about the spatial scaling of microbial diversity (Green & Bohannan 2006).

A better understanding of the spatial distribution of filamentous soil microorganisms is essential both to gain knowledge about the ecology of these communities and to plan sampling for future studies (Taylor 2002). This point is particularly crucial for EcM fungi because their extramatrical structures are highly variable between different species (Agerer 2001). Moreover, while emergent large-scale studies require a multiple-stand approach, it is necessary to maintain a representative description of microbial diversity at the plot scale. However, the sampling strategies applied at local scales differ greatly between studies comparing plots (Lilleskov et al. 2004; Buée et al. 2009), and the development of a standardised sampling method is, therefore, of great interest (Cox et al. 2010). Furthermore, for EcM communities, the handling of root tips (including washing and fastidious selection of living vs. dead or mycorrhizal vs. non-mycorrhizal specimens) remains a laborious component of studies that undermines the potential of high-throughput approaches. Examining soil could potentially be an alternative method for investigating the EcM community in particular. For oomycetes, baiting is classically performed directly in soil samples (Davison & Tay 2005).

The main aim of this study was to thoroughly explore the fungal (EcM) and oomycete community associated with beech trees in a relatively homogeneous plot to propose a compromise between sampling and sequencing efforts for high-throughput studies. For this purpose, we investigated the spatial (horizontal and vertical) distribution of these microorganisms in relation to a number of edaphic parameters and compared the fine root system against bulk soil as microbial reservoirs. We tested the following hypotheses: (1) the fungal

and oomycete communities are not evenly distributed within the plot but instead show a spatial structure, possibly related to environmental factors; (2) sampling a limited set of trees enables the microbial community of a relatively homogeneous plot to be described; and (3) the soil fungal community is as effective as the fine root fungal community for describing ectomycorrhizal diversity using next-generation sequencing.

## Materials and methods

### Site description and sampling

The Lignéville (Vosges, France) forest is a temperate forest (48°07'32"N, 5°59'51"E) situated at 380 m elevation. The experimental plot was established in a 3 500 m<sup>2</sup> area dominated by 90 % beech (*Fagus sylvatica*), along with a few oak and spruce trees. All of the contiguous beech trees in this area were selected for the study ( $n = 20$  trees). The diameter of the trees at a 1.30 m height ranged from 30 to 80 cm. The litter was removed, and four soil cores (8 cm diameter) were collected at 1 m from the trunk base of each tree. The four cores were combined, with the upper (0–10 cm deep) and lower (10–20 cm deep, sandy loam) horizons kept separate. The samples were collected on 11 Dec 2009 and were kept frozen until processing. Soil analyses of sub-samples were carried out by the Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras (<http://www5.lille.inra.fr/las>) to determine the pH (water method), total carbon (C) and total nitrogen (N) contents (NF ISO 10694 and NF ISO 13878) and phosphorus (P) content (Duchaufour & Bonneau 1959).

The root system present in each sample was separated from the soil using a 5 mm sieve. The remaining soil was gently cleaned from the roots in tap water, and the coarse roots were discarded (diameter > 2 mm). The fine roots (including root tips and residual adhering soil) were then lyophilised and ground with a mortar and pestle. Total genomic DNA extraction was carried out using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) for fine root samples (50 mg of the homogeneous powder) and the Fast DNA Spin Kit for Soil (MPBio) for soil samples (500 mg of homogeneous wet soil). Approximately 15 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP) was first added to each sample, and the manufacturers' instructions for the kits were then followed. The genomic DNA was then purified twice in PVPP columns.

### PCR amplification, amplicon purification and library preparation

Upper and lower horizon samples were processed independently. The fungal ITS1 region (Schoch *et al.* 2012) was amplified from both the fine root and soil DNA with the ITS1F (CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA) and ITS2 (GCTGCGTCTTCA TCGATGC) primers (Gardes & Bruns 1993). ITS1F was chosen over ITS1 because the latter primer binds to plant DNA more easily (Gardes & Bruns 1993 and personal unpublished results), which could decrease the fraction of fungal reads. The oomycete ITS1 region was amplified only from the soil samples using nested PCR: the first round was performed with the ITS6 (GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG) and ITS4 (TCCT

CCGCTTATTGATATGC) primers (White *et al.* 1990), and the second round with the primer pair ITS6 and ITS7 (AGCGTTCTTCATCGATGTGC) (Cooke *et al.* 2000). For 454 Titanium pyrosequencing of multiplexed samples, the forward primer (ITS1F or ITS6) was linked to a 4-base multiplexed identifier (MID) and adaptor A (CGTATCGCCTCCCTCGCGCC ATCAG), whereas the reverse primer (ITS2 or ITS7) was adjoined with adaptor B (CTATCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG).

The amplification mixture was prepared in a 20  $\mu$ l volume, obtaining final concentrations of 0.4 X enzyme buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.12 mg ml<sup>-1</sup> BSA, 0.2 mM each dNTP, 0.2  $\mu$ M each non-tagged primer (ITS6 and ITS4) or 0.8  $\mu$ M each tagged primer (ITS1F and ITS2 or ITS6 and ITS7) and 0.05 U  $\mu$ l<sup>-1</sup> Sigma Taq polymerase. The GeneAmp 9700 system was used with the following program for fungi: 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 40 s at 53 °C and 45 s at 72 °C, with a final step of 7 min at 72 °C. For nested PCR, the first round consisted of 5 min at 95 °C, followed by 20 cycles of 30 s at 95 °C, 40 s at 53 °C and 1.5 min at 72 °C, with a final step of 7 min at 72 °C. The first-round amplicons were diluted 10 times, and the second-round program was as follows: 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 30 s at 95 °C, 40 s at 53 °C and 10 s at 72 °C, with a final step of 7 min at 72 °C.

Four 20  $\mu$ l reactions were run in parallel for each sample, which were then pooled and purified on an MSNU030 Multi-Screen<sub>HTS</sub> PCR Plate (Millipore Corporation), with two washes using 100  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O and solubilisation of the amplicons in 40  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. The concentration of the purified tagged amplicons was measured three times with a NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 spectrophotometer, and equimolar pooling was carried out. In total, we obtained three independent libraries of 40 samples, corresponding to fine root-associated fungi, soil fungi and oomycetes from soil. Thus, three independent runs were conducted with 40 MIDs each, in equal proportions. The 454 pyrosequencing was performed by Génomscope (Evry, France). The raw data were deposited on the Sequence Read Archive website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under the project identifier PRJEB583 and the study accession ERP001914. The three libraries are under the following run accessions: ERR185063 (alias run\_1.TCA.AQN\_AOTS\_GK5X8RX01 for soil microbes amplified with ITS1F-ITS2), ERR185064 (alias run\_2.TCA.AQN\_DOTS\_GRD572402 for soil microbes amplified with ITS6-ITS7) and ERR185065 (alias run\_5.TCA.AQN\_BOTS\_GJVVFH05 for fine root-associated fungi amplified with ITS1F-ITS2).

### Bioinformatics analysis

The sequences were sorted into different files according to their multiplex identifier (MID) using sfffile software, with no mismatches allowed for the MIDs, which were then removed. The sequences were cleaned (trimming and denoising) with trim.flows in Mothur version 1.20.1 with the default parameters (Schloss *et al.* 2009). The internal transcribed spacer 1 (ITS1) was extracted using Fungal ITS extractor, version 2 (Nilsson *et al.* 2010). After extraction of the ITS1 region, the sequences were filtered based on a minimal length of 100 bp. Out of a total of 362 660 sequences, 212 285 (58.5 %) corresponding to the three libraries, were retained for downstream analyses. Molecular operational taxonomic units (MOTUs) were



generated after six successive clusterings using Uclust version 3.0 (Usearch version 5.2.32) with the parameter  $iddef = 2$  (Edgar 2010) at a 97 % similarity. The first clustering included all of the sequences, and subsequent clusterings were conducted with the batch of consensus sequences from the previous clustering. This allowed the redundancy of the MOTUs to be decreased (data not shown). Taxonomic assignation of a consensus sequence (available upon request) generated by Uclust was performed against a curated GenBank database (Feb 2012), excluding environmental sequences, using the Basic Local Alignment Search Tool algorithm Blastn version 2.2.23 (Altschul et al. 1990) with the filter turned off (i.e., segments of the query sequence with a low compositional complexity were not masked off). In addition, an R house script was used to assign MOTUs with the following selected criteria:  $e\text{-value} \leq e-50$ , identity  $>90\%$  for the genus and  $\geq 97\%$  for the species level. Some synonyms were corrected using the online Species Fungorum database (<http://www.speciesfungorum.org>). The MOTUs assigned to the same species were subsequently grouped together, further reducing the total number of MOTUs. Unassigned MOTUs were considered to correspond to fungi because the applied ITS1F-ITS2 primer pair shows good specificity for the detection of Dikarya.

### Statistical analyses

The two horizons were compared regarding their edaphic parameters with Student's *t*-test, using the *t.test* function in R. To assess the suitability of the sequencing depth and sampling effort required to estimate microbial diversity, species accumulation curves were computed using the *specaccum* function of the vegan R package (R Development Core Team 2011; Oksanen et al. 2011). The rarefaction method was applied. Prior to rarefaction, one randomly chosen sequence per MOTU was discarded to eliminate singletons (MOTUs supported by only one sequence), as suggested by Unterseher et al. (2011). Four sequencing efforts were tested with respect to rarefaction accumulation trees, corresponding to 100 %, 75 %, 50 % and 25 % of the 210 134 retained sequences. Additional rarefactions were performed for each habitat independently (SS, soil from the superior horizon; SI, soil from the inferior horizon; RS, fine roots from the superior horizon; and RI, fine roots from the inferior horizon) considering the ITS1F-ITS2 dataset, because only this primer pair was used in all four habitats.

The term fungal community will be used to refer to the entire set of MOTUs. The MOTUs were categorised as EcM fungi if they were assigned to a genus or a species described as such or suggested to be a putative EcM fungus in the literature (Rinaldi et al. 2008; Smith & Read 2008; Tedersoo et al. 2010). The rarefied fungal richness was estimated with rarefaction curves (*rarefy* function from the vegan R package, singletons removed) including 7 600 fungal sequences per tree, which was the minimum sequencing depth available. Then, the rarefied EcM richness was determined by multiplying the rarefied fungal richness by the proportion of EcM sequences per sample. In addition, to compare the four habitats (SS, SI, RS, RI), the rarefied fungal and EcM richnesses per sample were estimated when applicable at a depth of 1 100 sequences (ITS1F-ITS2 dataset only,  $>15$  samples per habitat).

The community structure was analysed at two levels: (i) the plot level, consisting of the samples obtained by merging the samples from each tree ( $n = 20$ ); and (ii) the tree level, considering only the sequences from the ITS1F-ITS2 dataset, with samples from the four different habitats kept separate ( $n = 80$ ). As one sequence does not necessarily represent one individual and because abundance is biased in other respects (Amend et al. 2010), the binary matrices of the presence of non-singleton MOTUs were computed from the abundance matrices. The binary matrices were used to perform correspondence analysis (CoA) at the plot and tree levels with the *dudi.coa* function of the ade4 package (Dray & Dufour 2007). The MOTUs present in less than three unit samples, according to the level studied, were discarded to prevent distortion of the CoA analysis by rare MOTUs. The position of a tree or sample on a CoA axis will hereafter be used as a measure of the community composition.

From the binary matrix of MOTU presence at the plot level, a similarity matrix was computed using the Sørensen index, i.e.,  $2^*J/(A + B)$ , with *J* representing the shared number of species between two trees, and *A* and *B* representing the total number of species of each of the compared trees. For this calculation, the *designdist* function of the vegan R package was used. The matrix of Euclidean distance was computed from the coordinates with the *dist* function of the stats R package. Mantel's tests and correlograms were performed using the vegan *mantel* and *mantel.correlog* functions, respectively, with the Spearman method. The distance classes were calculated following the Sturge equation, as stated by default in the *mantel.correlog* function. The *bioenv* function (vegan R package), with a Spearman model and Bray dissimilarity distances, was employed to determine the subset of environmental variables showing the best correlation with the fungal community dissimilarity at the plot level.

A variance analysis using the *lm* function of R was conducted to test for the effects of the horizon, (superior or inferior), the sample material, (soil or fine roots) and their interaction on the richness and community composition at the tree level. The correlations at the plot level between the estimated richness or the community composition and the edaphic parameters (mean values of the two horizons) were tested with a regression analysis, using the *lm* function in R.

## Results

### Microbial diversity

The mean number of sequences per sample after the cleaning steps was 1 768 (min: 226, max: 4 416, Table 1). Approximately 57 % of the MOTUs were non-singletons. Only 36.9 % of the non-singleton MOTUs could be assigned to a genus or a species. Among these MOTUs, 89 % belonged to the Dikarya, and 41 % were classified as EcM (Table 1). A total of 630 and 111 non-singleton MOTUs were found exclusively from the soil substratum using the ITS1F-ITS2 and ITS6-ITS7 primer pairs, respectively, while 263 MOTUs were detected by both pairs. Oomycetes were only detected with the ITS6-ITS7 primer pair and only in the soil samples. This primer pair was not as

**Table 1 – Number of sequences and number of MOTUs in the datasets. The number of MOTUs in the combined dataset was not the sum of the two datasets as they were redundant**

	ITS1F-ITS2 dataset (two libraries = 80 samples)	ITS6-ITS7 dataset (one library = 40 soil samples)	Combined dataset (three libraries = 120 samples)
<b>Total number of 454 reads</b>	261 771	100 889	362 660
<b>Number of retained quality sequences</b>	156 242 (59.7 %)	55 936 (55.4 %)	212 178 (58.5 %)
<b>Range of sequences per sample<sup>a</sup></b>	414–3 742	226–4 416	226–4 416
<b>Range of sequences per sampled tree<sup>b</sup></b>	4 315–11 570	1 435–5 340	7 713–13 860
<b>Number of MOTUs</b>	1 840	490	2 044
<b>Number of nonsingletons<sup>c</sup></b>	1 085 (59.0 %)	374 (76.3 %)	1 173 (57.4 %)
<b>Assigned nonsingletons</b>	413	187	433
<b>Taxonomic-level assignment of nonsingletons</b>			
Not assigned	672	187	740
Genus	226	81	236
Species	187	106	197
<b>Phylum-level repartition of the assigned nonsingletons</b>			
Basidiomycota	209	129	216
Ascomycota	169	20	169
Zygomycota	6	6	6
Other or uncertain fungal lineages	29	22	32
Oomycota	0	10	10
<b>Ecological mode repartition of the assigned nonsingletons<sup>d</sup></b>			
ECM <sup>e</sup>	177	103	177
Saprobe <sup>e</sup>	143	59	151
Plant pathogen <sup>e</sup>	15	6	18
Other or unknown mode	83	20	92

a An homogeneous sample of soil or fine roots originating from four mixed cores, taken around a beech tree at 0–10 cm or 10–20 cm depth.

b Sum of the four samples from the four different habitats (see<sup>a</sup>) per tree.

c MOTUs supported by two sequences at least.

d Some species are classified as both saprobe and tree pathogen, thus counted twice.

e True and putative are summed.

specific as suggested, as it amplified many basidiomycetes in particular (representing 129 of the 187 assigned MOTUs amplified with this primer pair) and even four plant taxa, which were removed from the dataset prior to conducting any analysis. The ITS6-ITS7 primer pair allowed the detection of three EcM MOTUs (*Russula rubra*, *Russula* sp18 and *Cortinarius armillatus*) that were not detected in the soil with ITS1F-ITS2, but these three MOTUs were detected in the fine root habitat with ITS1F-ITS2. The most abundant MOTU (14 321 sequences, abundance will hereafter refer to the number of sequences per MOTU) corresponded to a Saprolegniale (Oomycota, Saprolegniaceae). Only 463 sequences from Pythiaceae (i.e., 0.8 % of the sequences from the ITS6-ITS7 dataset) were detected in the plot, representing only a few species: *Phytophthora plurivora*, an unidentified *Phytophthora* species from clade 7a (cf Blair et al. 2008), *Pythium sylvaticum* and an unidentified species of *Pythium*.

Analysis of the sequences obtained with ITS1F-ITS2 and ITS6-ITS7 primer pairs from the soil and fine root samples together revealed that the 20 most abundant MOTUs (overall number of sequences) were EcM fungi, including seven *Russula* species (*Russula brunneoviolacea*, *Russula cyanoxantha*, *Russula ochroleuca*, *Russula vesca*, *Russula nigricans*, *R. sp1* and *Russula ionochlora*), two *Boletus* species (*Boletus pruinatus* and *Boletus erythropus*), *Cenococcum geophilum*, *Cortinarius* sp1 and *Elaphomyces* sp1 (Table 2). Other abundant MOTUs included six non-assigned MOTUs that were amplified only with ITS6-ITS7 and two *Mortierella* species (*M. sp1* and *Mortierella humilis*).

There was a significant positive correlation between the log of abundance and the frequency (Fisher's  $F = 2\,149.5$ ,  $p < 0.001$ ; the frequency refers to the number of trees or samples in which the MOTU was present). Among the MOTUs supported by more than 1 000 sequences, 74.4 % were present on more than 15 trees, while only 14 % were present on fewer than 10 trees. The abundant MOTUs present on less than 10 trees included *Cortinarius* sp1, *Russula* sp1 and MOTU6. The community matrix, including the ecological mode for the identified MOTUs, is available as a [Supplementary Table](#).

The rarefaction curves tended towards saturation (Fig 1A and B). A total of 90 % of the estimated plot richness was retrieved when only 15 out of the 20 trees were sampled with a sequencing effort of 10 500 sequences per sampled tree (Fig 1B). However, it was necessary to sample all 20 trees to achieve such a result if a sequencing effort of 7 880 sequences per sampled tree was employed (Fig 1B). An estimated richness of 1 020 MOTUs was similarly obtained when either 11 trees with 100 % of the sequences or 20 trees with half of the sequences per tree were considered. When computed individually for each of the four habitats (fine roots or soil from the upper horizon and fine roots or soil from the lower horizon), the rarefaction curves also tended towards saturation (Fig 2A and B).

The fungal and EcM richness estimated from the rarefaction curves ranged from 196 to 308 non-singleton fungal MOTUs per tree (including unassigned MOTUs) and from 71 to 187 EcM MOTUs per tree. The rarefied fungal and EcM richness

**Table 2 – The 20 most abundant MOTUs in the plot. The abundance was the number of sequences and the frequency was the number of trees (max = 20) around which the MOTU was found**

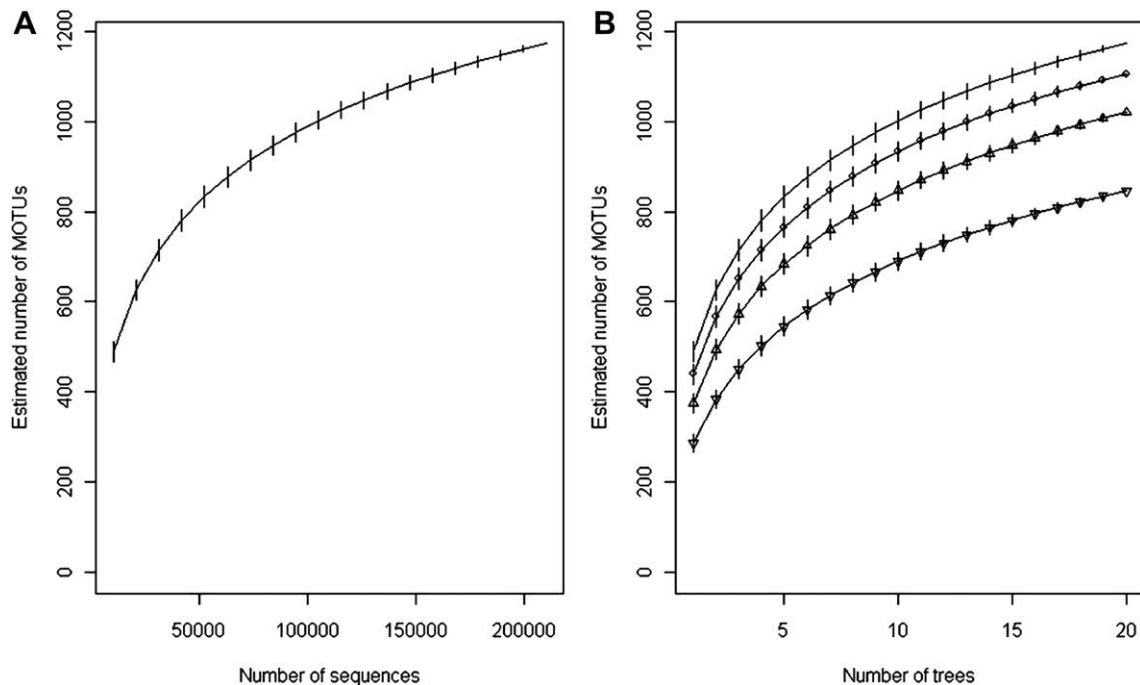
MOTU	Abundance	Frequency	GI number	Best BLAST hit	Identity	E-value
MOTU1	14 321	19	323302256	<i>Saprolegnia megasperma</i>	90.3	1,00E-45
<i>Russula brunneoviolacea</i>	12 069	17	91199853	<i>Russula brunneoviolacea</i>	98.4	2,00E-90
<i>Russula cyanoxantha</i>	11 088	19	22024448	<i>Russula cyanoxantha</i>	99.3	2,00E-66
MOTU2	9 257	16		No hit found		
<i>Boletus pruinatus</i>	7 833	20	61657552	<i>Boletus pruinatus</i>	98.9	3,00E-92
MOTU3	6 964	19	323302256	<i>Saprolegnia megasperma</i>	87.8	4,00E-36
<i>Cenococcum geophilum</i>	6 917	20	55832969	<i>Cenococcum geophilum</i>	97.8	3,00E-64
MOTU4	5 220	20	150439140	<i>Homobasidiomycete</i> sp	90.5	3,00E-27
<i>Mortierella</i> sp1	5 213	20	183013810	<i>Zygomycete</i> sp	93.3	6,00E-53
<i>Russula ochroleuca</i>	5 193	19	308055381	<i>Russula ochroleuca</i>	100	2,00E-75
MOTU5	4 761	18	323302256	<i>Saprolegnia megasperma</i>	89.2	3,00E-36
<i>Mortierella humilis</i>	4 512	20	119444359	<i>Mortierellales</i> sp	98.1	3,00E-70
<i>Russula vesca</i>	3 868	13	308055461	<i>Russula vesca</i>	100	9,00E-90
<i>Cortinarius</i> sp1	3 733	7	57869258	<i>Cortinarius cagei</i>	99.4	6,00E-84
<i>Russula nigricans</i>	3 541	15	91199858	<i>Russula nigricans</i>	99.2	8,00E-59
<i>Boletus erythropus</i>	3 409	19	300387792	<i>Boletus erythropus</i>	97.9	7,00E-91
<i>Elaphomyces</i> sp1	3 396	18	189306999	<i>Elaphomyces</i> cf. <i>granulatus</i>	91.8	2,00E-53
<i>Russula</i> sp1	3 137	8	23393838	<i>Russula rosea</i>	96.9	1,00E-82
MOTU6	3 013	9	48766839	<i>Saprolegnia semihypogyna</i>	88.5	6,00E-38
<i>Russula ionochlora</i>	2 871	12	307159052	<i>Russula ionochlora</i>	97.5	2,00E-72

per tree were positively correlated ( $F = 4.44$ ,  $p < 0.0494$ ). The fungal richness was neither spatially structured (Mantel  $r = 0.0448$ ,  $p = 0.34$ ) across the plot nor linked to any edaphic parameter, nor to the dry fine root biomass (Table 3). This was also true for the EcM richness (Table 3) (Mantel  $r = 0.0841$ ,  $p = 0.192$ ).

The rarefied fungal richness was significantly lower within the inferior horizon ( $F = 54.468$ ,  $p < 0.001$ ) and in the fine root samples ( $F = 12.299$ ,  $p < 0.001$ ). There was also a significant

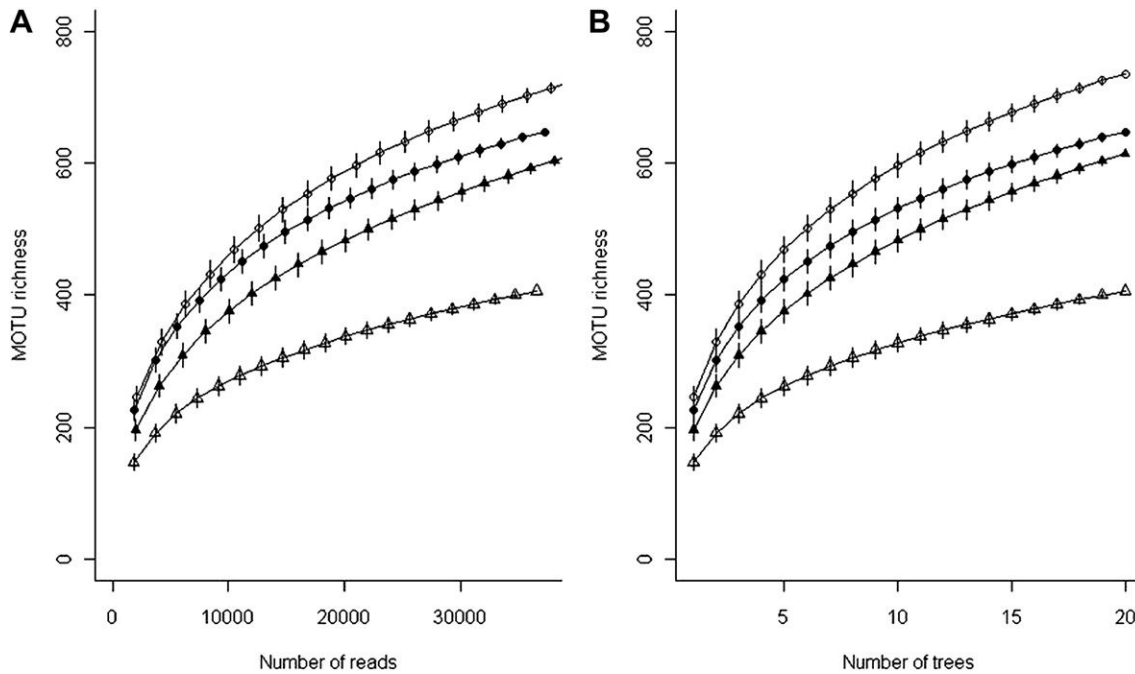
interaction between the two factors (horizon \* material) ( $F = 20.815$ ,  $p < 0.001$ ). However, the rarefied EcM richness was different between the two horizons ( $F = 15.9351$ ,  $p < 0.001$ ) but not between the two types of material ( $F = 0.4939$ ,  $p = 0.4846$ ). A weak interaction between the two factors was observed ( $F = 4.4014$ ,  $p = 0.0398$ ).

Notably, the edaphic parameters (pH, C:N ratio and phosphorus) were significantly different between the two horizons (data not shown), and the fine root system was more



**Fig 1 – Rarefaction curves accumulating sequences (A) or trees (B) obtained with the function ‘specaccum’ of the *vegan* R package. Sequences, obtained with ITS1F-ITS2 and ITS6-ITS7 primer sets, were clustered at 97 % and one sequence per MOTU was removed, eliminating *de facto* the singletons. Four sequencing efforts are presented: 100 %, 75 % (circle), 50 % (triangle) and 25 % (inverted triangle) of the 210 134 retained sequences.**





**Fig 2 – Saturation curves for four distinct habitats: soil (closed symbols), root (open symbols), organo-mineral horizon (circles), and mineral horizon (triangles) accumulating sequences ('accumresult' function of the BiodiversityR R package) (A) or trees ('specaccum' function of the vegan R package) (B). Sequences, obtained with ITS1F-ITS2 primer set only, were clustered at 97 %. One sequence was discarded per MOTU, eliminating *de facto* the singletons.**

abundant in the upper horizon than in the lower horizon, which presented mean dry fine root masses of 5.8 g/tree and 1.7 g/tree, respectively ( $t = 9.2675$ ,  $p < 0.001$ ).

#### Microbial structure at the plot level

The soil characteristics showed variability within the plot: the soil carbon content ranged from 26.4 to 59.8 g kg<sup>-1</sup>, nitrogen

ranged from 1.3 to 2.6 g kg<sup>-1</sup>, the C:N ratio ranged from 19.9 to 24.5, phosphorus ranged from 0.08 to 0.10 g kg<sup>-1</sup>, and the soil pH ranged from 4.0 to 4.3. The clay:sand ratio measured in the lower horizon was  $0.24 \pm 0.03$ .

The 681 MOTUs associated with at least three trees were retained for the CoA computed at the plot level ( $n = 20$  trees) (Fig 3A). The trees in the studied plot were clearly separated on the first axis of the CoA (Fig 3A). The distribution of the trees in

**Table 3 – Relationships between richness or community composition of MOTUs or of EcM species and environmental variables at the plot level ( $n = 20$ )**

	Spatial variables			Edaphic variables		Biotic variable
	X	Y	Soil pH	Carbon:nitrogen ratio	Phosphorus content	Dry root mass
Fungal richness <sup>a</sup>	0.0487 (0.83)	0.2848 (0.60)	0.1553 (0.70)	2.4047 (0.14)	2.1968 (0.16)	1e-04 (0.99)
EcM richness <sup>a</sup>	0.2304 (0.64)	0.3443 (0.56)	0.0245 (0.88)	0.701 (0.41)	0.5146 (0.48)	1.828 (0.19)
MOTUs community composition:CoA Axis1 <sup>b</sup>	0.2385 (0.63)	57.208 ( <b>&lt;0.001</b> )	2.9838 (0.10)	7.7554 ( <b>&lt;0.05</b> )	5.834 ( <b>&lt;0.05</b> )	0.0357 (0.85)
MOTUs community composition:CoA Axis2 <sup>b</sup>	3.2323 (0.09)	1.1868 (0.29)	1.7193 (0.20)	4e-04 (0.98)	9.538 ( <b>&lt;0.01</b> )	0.4049 (0.53)
EcM community composition:CoA Axis1 <sup>c</sup>	0.1029 (0.75)	17.026 ( <b>&lt;0.001</b> )	2.1135 (0.16)	8.9674 ( <b>&lt;0.01</b> )	1.3713 (0.26)	0.01 (0.92)
EcM community composition:CoA Axis2 <sup>c</sup>	0.0985 (0.76)	0.003 (0.96)	0.3806 (0.55)	0.2979 (0.59)	0.0128 (0.91)	0.0368 (0.85)

Community composition was defined as the position of the tree on the CoA axis at the plot level (see Fig 3A for CoA with the MOTUs, CoA with EcM species not shown). Fisher's *F* statistics with the probability value into brackets. Significant values ( $p < 0.05$ ) in bold. Each variable was tested independently.

a Rarefied richness estimated for 7 200 sequences per sampled tree.

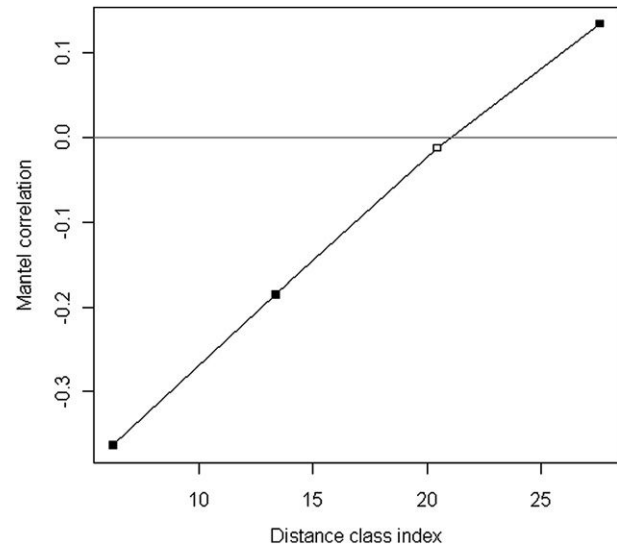
b Axis values of the CoA based on 681 MOTUs.

c Axis values of the CoA based on 107 EcM species.

the CoA was not linked to the fungal lifestyle (EcM, pathogen or saprobe), as the MOTUs from these three groups were evenly dispersed in the CoA (data not shown). The first axis was positively correlated with one of the geographical coordinates of the trees, with the trees showing a high value on this axis being mainly distributed in the northern part of the plot (Table 3, Fig 3B). The second axis of the CoA was, however, not related to any geographical parameter (Table 3). The Mantel test also clearly indicated that the fungal community showed a spatial structure, with a significant autocorrelation being detected for samples within the 0–15 m distance class (Mantel statistic  $r = -0.4972$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig 4). The same result was obtained when considering the EcM community alone ( $r = 0.3$ ,  $p < 0.05$ ).

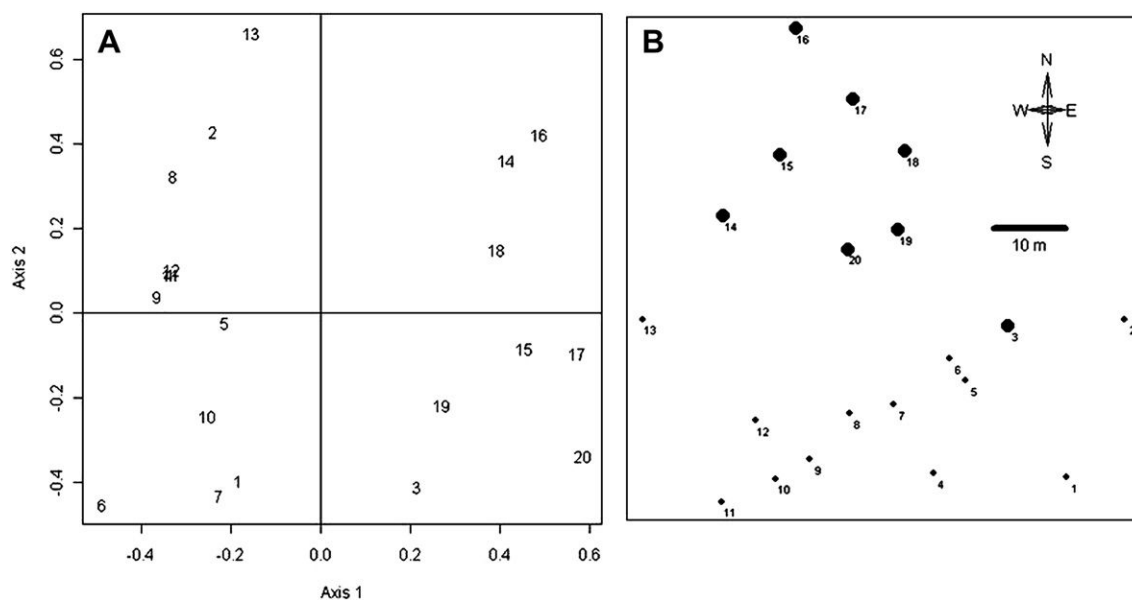
The first axis of the CoA was linearly related with the C:N ratio and P content, while the second axis was only related to the P content (Table 3). When only the EcM fungi were considered in the CoA, similar results were observed (indicating a significant relationship between CoA axis 1 and the C:N ratio), although there was no significant relationship with the P content (Table 3). The model showing the best correlation between the environmental variables and the fungal or EcM community data combines two parameters: the C:N ratio and P content. These two variables were positively correlated with the latitude ( $F = 6.865$ ,  $p = 0.0174$  and  $F = 5.782$ ,  $p = 0.0272$  for C:N ratio and P soil content respectively).

The EcM fungi that presented a high value on the first axis of the CoA (over 1) were *Amanita fulva*, *A. porphyria*, *Cortinarius angelesianus*, two unidentified *Cortinarius* species and *Russula mairei*. These fungi were almost exclusively found associated with trees located in the northern part of the plot, where the soil exhibited both a higher phosphorus content and higher C:N ratio. Previously mentioned abundant EcM species, such



**Fig 4 – Mantel correlogram for the MOTUs community at the plot level, based on the binary Sørensen similarity coefficient. Distance class index were the values delimiting distance classes. Negative Mantel statistics correspond to positive autocorrelation. Dark symbols indicate significant Mantel statistics ( $\alpha = 0.05$ ).**

as *R. brunneoviolacea*, *R. cyanoxantha* and *B. pruinatus*, were not discriminated in the CoA, which was also the case for MOTU1. No clear pattern was seen for the few observed Pythiaceae. *Phytophthora plurivora*, *Phytophthora* clade 7a, *P. sylvaticum* and *Pythium* sp1 were associated with 4, 3, 1 and 2 non-adjacent trees out of the 20, respectively.



**Fig 3 – Distribution of the 20 beech trees according to their associated fungal and oomycete community on a correspondence analysis (CoA). The CoA was done on presence/absence of 681 MOTUs obtained with ITS1F-ITS2 and ITS6-ITS7 primers (A). The percentages of variation explained by the first and second axis are 13.2 and 9.9 % respectively; the numbers are the tree numbers. Note that trees numbered 4, 11 and 12 are superimposed. Spatial distribution of the 20 beech trees on the experimental plot (B). Dot size was related to the first axis value on the CoA beside, i.e. small dots for negative values and large ones for positive values. The axis values on the CoA were used for statistical tests presented in Table 3.**

### Structure of the fungal assemblage at the tree level

Among the 1 085 non-singleton MOTUs obtained, 681 (58.0 %) were shared by the two horizons, whereas 340 (29.0 %) were exclusively found in the upper layer, and 152 (13.0 %) were exclusive to the lower layer (based only on data obtained with ITS1F-ITS2, as this was the only primer pair used for fine root samples). More than 66 % (118/177) of the EcM MOTUs were found in both horizons.

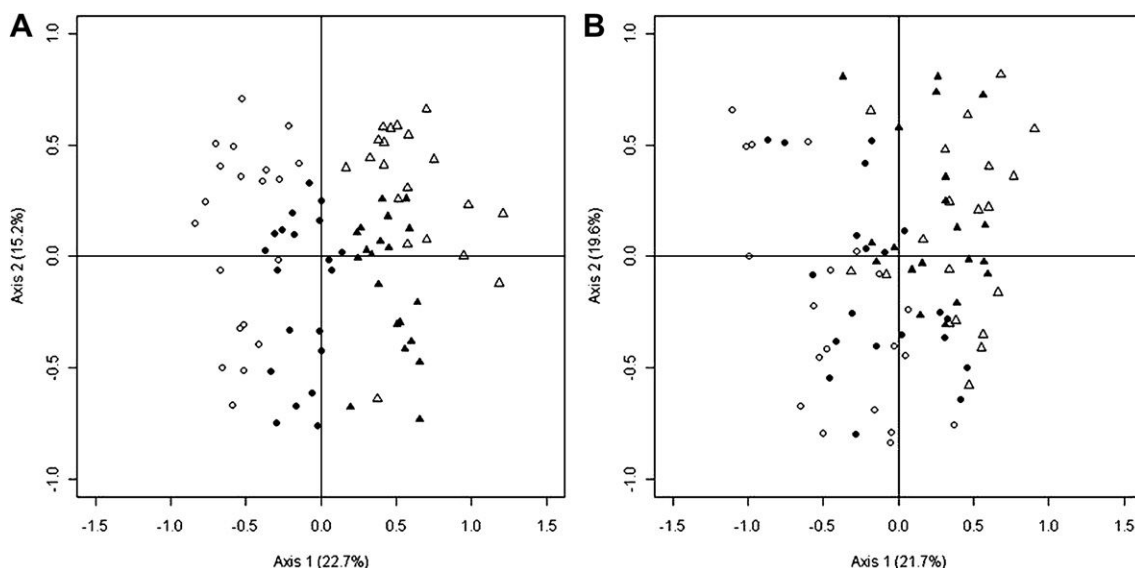
A total of 700 non-singleton MOTUs (64.5 %) were shared by the fine root and soil samples, while 193 (17.8 %) were exclusively found in the soil samples and 192 (17.7 %) in the fine root samples. Among the MOTUs exclusively found in the fine root samples, only 28 (14.6 %) were supported by at least ten sequences, and the most abundant corresponded to an ericoid mycorrhizal fungus, *Oidiodendron* sp3 (116 sequences). Notably, 86 % of the EcM MOTUs found in the fine root samples were also retrieved in the soil samples (134/155). The EcM MOTUs that were not detected in the soil samples corresponded to six *Cortinarius* species including *C. delibutus*, *C. sp18*, three *Boletus* (*B. sp2*, *B. sp3*), three *Russula*, two *Cladophialophora*, *Cenococcum* sp3, *Exophiala* sp2, *Tuber puberulum*, *Hebeloma* sp1, *Hydnum* sp1, *Meliniomyces* sp2 and *Tomentella* sp8. In contrast, some EcM MOTUs were detected in the soil samples, but not in the fine root samples (22/156, or 14 %, corresponding to nine *Cortinarius*, four *Russula*, four *Lactarius*, *Amanita* sp5, *Hebeloma radicosum*, *Hydnum ellipsosporum*, *Inocybe lacera* and *Tomentella* sp7).

The 690 MOTUs present in at least three samples were retained for the CoA. The four investigated habitats, i.e., fine roots or soil from the upper or lower horizon ( $n = 80$ ), were distinct regarding the microbial community (Fig 5A). The first axis of the CoA explained 22.7 % of the variance. It separated the four habitats, particularly the samples of the upper horizon (negative values of axis 1), from the samples of the lower horizon (positive values of axis 1) ( $F = 242.15$ ,  $p < 0.001$ ). There

was a significant interaction between the horizon (superior or inferior) and material (fine roots or soil), with the difference between the horizons being far less pronounced for the soil material ( $F = 36.94$ ,  $p < 0.001$ ). The second axis explained 15.2 % of the variation and was related to the material ( $F = 19.65$ ,  $p < 0.001$ ), but not to the horizon ( $F = 2.22$ ,  $p = 0.14$ ). The CoA computed only taking into account the 127 EcM fungi present in at least three samples showed a notably different pattern (Fig 5B). The distribution of the samples from the four habitats was different for the EcM MOTUs compared to what was observed for all of the fungal MOTUs. While the distribution on axis 1 was similar, with a significantly higher value observed for the lower horizon, ( $F = 53.86$ ,  $p < 0.001$ ) as well as a significant horizon \* material interaction ( $F = 7.53$ ,  $p = 0.0075$ ), the distribution on axis 2 was different. Indeed, the fine roots and soil samples were not significantly different regarding their position on axis 2 ( $F = 0.78$ ,  $p = 0.38$ ). Only the horizon factor significantly influenced the position on axis 2 ( $F = 12.93$ ,  $p < 0.001$ ).

### Discussion

A description of the fungal community at the plot level was achieved using 454 sequencing, which therefore allowed a sampling strategy to be outlined, including the corresponding sequencing effort required for future large-scale community studies where the plot is the basic unit. Remarkably, our work suggested that the soil habitat can be a good proxy for studying mycorrhizal assemblages. Additionally, this study was among the first to investigate oomycetes in forest soils using high-throughput sequencing, although these organisms are relatively difficult to detect compared to fungi. The fungal community observed in the present study showed spatial autocorrelation at a distance of  $<15$  m and exhibited a differentiated vertical distribution along the soil profile.



**Fig 5 – Correspondence analysis for fungal (690 MOTUs) (A) or ectomycorrhizal (127 EcM MOTUs) (B) communities in four different habitats of a beech plot ( $n = 80$ ): soil (closed symbols), root (open symbols), superior horizon (circles), and inferior horizon (triangles). A presence/absence matrix of the MOTUs present in at least three samples was used for the correspondence analysis. All the MOTUs considered were obtained with ITS1F-ITS2 primers. The percentages indicate the variation explained by each axis.**

To study the microbial community at a plot level, a compromise was required between the number of samples and the sequencing depth per sample (Taylor 2002; Cox et al. 2010). Indeed, as the number of sequences or samples increased, the number of MOTUs increased, with a similar proportion of singletons being recorded. In our case, the number of sequences was sufficient to describe the fungal community at the plot level and at the tree level, for which the community was described in the four habitats separately (RS, SS, RI, SI). Hence, under our experimental conditions, we suggest that four soil cores (20 cm depth) and approximately 15 trees with a sequencing depth of 10 500 sequences per tree unit allowed a good description of the fungal community within our relatively homogeneous 3 500 m<sup>2</sup> plot to be obtained. The large number of basidiomycetes observed may represent a bias due to the use of the ITS1F primer (Bellemain et al. 2010).

Our work suggested that the soil habitat was a good proxy for studying mycorrhizal assemblages. Our description of the EcM assemblage was based only on the taxonomically assigned MOTUs and the still incomplete literature addressing the ecological mode of fungi. Despite this limitation, our findings are in accordance with previous studies (Rosling et al. 2003; Landeweert et al. 2005). In particular, the EcM richness was not dependent on the type of material (fine roots or soil), and the CoA of EcM MOTUs was not able to separate the samples. Moreover, most of the MOTUs that were absent from the soil samples were supported by a low number of sequences (less than 120/MOTU), and only 11 % (21/192) were EcM MOTUs. Thus, the MOTUs that were not detected in the soil were not found at a high abundance in the fine roots. High-throughput sequencing appears to smooth out the niche differentiation between fine roots and soil, as we could detect almost all of the MOTUs found in the fine root samples in the soil samples as well. Nevertheless, this method allowed us to investigate the fungal community present on the fine roots more thoroughly and to detect rare MOTUs associated exclusively with fine roots. However, Dickie et al. (2002) thought it unlikely that the hyphae of a fungal species present on root tips in a sample could be totally from the surrounding soil. Additionally, Landeweert et al. (2005) did not detect any fungal species that were present on root tips but absent from soil. Some EcM species appear to be more frequent as mycelia in the soil than as mycorrhizal root tips (Kjøller 2006), which was the case for many *Tomentella* species. In the present study, we indeed found that some EcM MOTUs were detected exclusively in the soil. However, this was not the case for *Tomentella*: *Tomentella sublilacina* and *Pseudotomentella tristis* were more frequent and more abundant in the fine root samples compared to the soil samples. Other *Tomentella* MOTUs were similarly frequent in the fine root and soil samples, with a higher number of sequences in the fine root samples. *Boletus* spp. were also found as frequently in the soil as in the fine root samples, although this genus has been reported to be more frequent as mycelia in soil than as mycorrhizas (Kjøller 2006). The findings reported in the literature are more conflicting for the *Cortinarius*. While Kjøller (2006) retrieved some species from root tips, but not from the soil, Genney et al. (2006) detected extramatrical mycelia of *Cortinarius* more frequently compared to their presence at root tips. Our data confirmed these conflicting reports, as among the 39

*Cortinarius* MOTUs observed, nine were recorded exclusively from soil, while six were observed exclusively in the fine root samples. *Cortinarius* is probably the largest agaricoid genus (Smith 1973), and it is therefore not surprising that species with large differences in ecology can be found in this group.

As is commonly observed, rare MOTUs dominated the community, apart from a few abundant MOTUs. Among the most abundant EcM MOTUs, a number are generalists (*C. geophilum*, *B. pruinatus*), are species associated with acidoclines (e.g., *R. ochroleuca*, *B. erythropus*) or are preferentially present in deciduous forests (*R. ionochlora* under *Fagus* especially, *R. nigricans*, *R. vesca*). Other, less abundant, species were also recorded that are preferentially associated with beech trees (e.g., *Leotia subdulcis*, *Russula fellea*, *A. citrina*, *R. mairei*) (Courtecuisse & Duhem 1994). Additionally, the presence of young individuals of several other tree species on the plot could explain the detection of *Leotia quietus*, an oak-specific fungus, and *Russula puellaris*, which preferentially exists in interactions with coniferous species. Additionally, *Oidiodendron* sp., which was the most abundant MOTU found only in the fine root samples, forms ericoid mycorrhizas with *Vaccinium* species (Dalpé 1986), which were identified in our forest site.

To our knowledge, this study is the first to investigate oomycetes in forest soils using high-throughput sequencing. We detected only a few MOTUs of Pythiaceae species compared to those that are potentially present in beech forests, which include *Phytophthora cactorum*, *P. cambivora*, *P. gonapodyides*, *P. inflata*, *P. sylvaticum*, *P. acrogynum*, *P. inflatum* and *P. anandrum* (Nechwatal & Oßwald 2001; Jung et al. 2005; Brasier & Jung 2006; Vettraino et al. 2008; Brasier 2009). However, Brasier (2009) estimated the number of potential *Phytophthora* species to be between 200 and 600, and 301 species of *Pythium* have been listed in the Index Fungorum to date. Compared to the 100 000 fungal species that have been described thus far (Hibbett et al. 2011), the proportion of four Pythiaceae MOTUs for 2000 putative fungal MOTUs was therefore somewhat expected. However, the Pythiaceae community is relatively difficult to detect (Scibetta et al. 2012) compared to fungi in general. Technical considerations could explain the small number of Pythiaceae detected. The specific primer sets used for nested PCR amplification (Cooke et al. 2000) were not as appropriate for environmental samples as for pure cultures. Indeed, a majority of the Dikarya were identified along with oomycetes within large (*Achlya*, *Phytophthora*, *Saprolegnia*, *Pythium*) and other unassigned MOTUs. New primers were recently reported for the detection of *Phytophthora* from soil and water samples that could improve the detection of these species in environmental samples (Scibetta et al. 2012). Furthermore, as for other fungi, we were not able to assign all of the MOTUs to the species level. Additionally, the sequences from *Phytophthora* clade 7a (approximately 230 bp) corresponded to *P. alni* subsp. *uniformis*, *P. fragariae* or *P. cambivora* reference sequences at a  $\geq 97$  % identity and 100 % coverage, and the sequences from *Phytophthora plurivora* (approximately 186 bp) also partially matched those of *P. inflata*. As few Pythiaceae species have been characterised thus far (Kroon et al. 2012) compared to EcM fungi, taxonomic affiliation remains a serious constraint in studying the Pythiaceae community. Improvements in technical and taxonomic methods for studying the Pythiaceae community are therefore



clearly needed. From an ecological point of view, *Phytophthora* and *Pythium* have not been found to be widespread at a stand scale (Davison & Tay 2005). The trees in our study site were very healthy, showing no symptoms of decline, such as crown transparency or small or yellowish foliage, suggesting that they were not infested by pathogenic *Phytophthora* species. The plot conditions were moderately favourable for the presence of *Phytophthora* and *Pythium*. Fine and coarse sand represented more than 60 % of the soil in the lower layer, and the soil pH range was between 4.0 and 4.3. *Phytophthora* have been found to be less frequent in acidic or sandy soils (Jung et al. 2000; Gómez-Aparicio et al. 2012). Furthermore, the date of sampling (beginning of Dec) was probably not the time when the highest load of Pythiaceae occurs in the soil habitat. However, the use of molecular techniques might have partly overcome this problem, as hard life stages and DNA may persist in the soil after the active season, as for fungi.

This study is among the few investigations to explore the spatial distributions of EcM species (Courty et al. 2008) and Pythiaceae species (Davison & Tay 2005; Gómez-Aparicio et al. 2012) in temperate forests. No spatial structure could be found for Pythiaceae. The fungal community in our study was spatially autocorrelated at a distance of <15 m, and autocorrelation has also been reported elsewhere (Lilleskov et al. 2004; Toljander et al. 2006). Toljander et al. (2006) found that the EcM community structure varied along a nutrient gradient characterised based on NH<sub>4</sub>, base saturation, C:N ratio and pH data, although they could not identify the relative importance of these factors. In the present study, the fungal and EcM communities were structured by the C:N ratio and phosphorus, but not by the pH, which was more homogeneous within the plot.

The vertical distribution of mycorrhizas has been reported in several studies in podzolic mixed and coniferous boreal forests (Tedersoo et al. 2003; Rosling et al. 2003; Lindahl et al. 2007), but it has also been explored rarely in temperate deciduous forests (Courty et al. 2008). At the plot level, the vertical abundance distribution was conserved, regardless of the examined material (fine roots or soil). In the present study, the dry fine root biomass, pH, C:N ratio and P were found to be confounding factors that varied with depth and that could be linked to the composition of the fungal community along the vertical profile. The higher fine root biomass observed in the upper organic horizon is in accordance with previous studies (Rosling et al. 2003; Bakker et al. 2008; Courty et al. 2008). These data were in agreement with those of Taylor (2002), Rosling et al. (2003) and Tedersoo et al. (2003), who advocated sampling the mineral horizon in addition to the organic horizon. Similar to most previous reports, *Cenococcum geophilum* was abundant and ubiquitous in the two horizons investigated. Some groups were, however, more abundant in one of the two layers. Indeed, the Cantharellales, such as *Clavulina cristata*, *Hydnum rufescens*, *Craterellus tubaeformis* and *Botryobasidium subcoronatum*, were more abundant in the first 10 cm, where they could play a role in organic matter processing. Likewise, the Atheliaceae *Piloderma fallax*, *Byssocorticium atrovirens*, *B. sp1* and *Tylospora asterophora*, which were more abundant in the upper layer, have previously been recorded in an organic substratum (Tedersoo et al. 2003). *Tomentella subtiliacina* was also mostly found in the organic layer (Courty et al. 2008), along with the several MOTUs assigned to the *Cladophialophora*. Two Helotiales, *Botrytis sp1* and *Cudoniella sp1*,

were also recorded in this upper layer, which is not consistent with the previous observation of the presence of *Cudoniella* in deeper soil (Jumpponen et al. 2010), but both fungi have been reported to show a preference for wet conditions. In contrast to the above species, *Armillaria sp1*, *Leotia lubrica*, *Leotia atrovirens* and *Microglossum sp1* were confined to the lower horizon.

---

## Conclusion

Our results showed that in an apparently homogeneous plot comprising 20 beech trees, the fungal and EcM communities exhibited a spatial variability linked to the examined edaphic parameters. Consequently, a sufficient sampling effort at a local scale should be applied to fully capture the fungal diversity present. In our temperate beech forest plot, we estimated that approximately 15 trees should be sufficient for this purpose. However, the laboratory work could be facilitated by employing bulk soil as a good, easy-to-handle substitute for the fine roots to study EcM assemblages using the pyrosequencing technique, although the relative abundance was not similar. The fungal and EcM communities also exhibited a vertical soil distribution, which could be explained by differences in soil parameters between the lower and upper horizons. Sampling several soil horizons is, therefore, encouraged for analyses of diversity, although it could be difficult for studies conducted at a large geographical scale, which encompass samples from several soil types with structurally different profiles. Care should be taken in extrapolating these findings to other situations (especially in different forest types or under different host trees), as only one plot was studied in the present work, and additional studies are required to confirm our findings.

---

## Acknowledgements

A.C.'s scholarship was funded by grants from Biodiversity and Climate Change: A Risk Analysis (BACCARA) European Research Project and from the Region Lorraine. We thank the Office National des Forêts for permitting sampling in the Lignéville forest. The authors are grateful to M. Morelet and J. Garbaye for helping with the identification of fungal lifestyles and J. Aguayo, C. Husson, J.-P. Maurice, and F. Le Tacon for elements of the Discussion. The authors also thank F. Martin for access to the UMR1136 IAM computing resources and two anonymous reviewers for their constructive comments, which helped to improve the manuscript.

---

## Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2013.01.002>.

---

## REFERENCES

Agerer R, 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to

- their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* **11**: 107–114.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403–410.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD, 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**: 5555–5565.
- Arcate JM, Karp MA, Nelson EB, 2006. Diversity of Peronosporomycete (Oomycete) communities associated with the rhizosphere of different plant species. *Microbial Ecology* **51**: 36–50.
- Balci Y, Balci S, Eggers J, MacDonald WL, Juzwik J, Long RP, Gottschalk KW, 2007. *Phytophthora* spp. associated with forest soils in Eastern and North-Central U.S. Oak Ecosystems. *Plant Disease* **91**: 705–710.
- Bakker MR, Turpault M-P, Huet S, Nys C, 2008. Root distribution of *Fagus sylvatica* in a chronosequence in western France. *Journal of Forest Research* **13**: 176–184.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H, 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* **10**: 189.
- Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM, Kang S, 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 266–277.
- Brasier CM, Jung T, 2006. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe. In: Brasier CM, Jung T, Oßwald W (eds), *Progress in Research on Phytophthora Diseases of Forest Trees. Proceedings of the 3rd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Freising, Germany 11th–17th September 2004*. Forest Research, Farnham, UK, pp. 5–16.
- Brasier CM, 2009. *Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there? In: Goheen EM, Frankel SJ (Tech. Coords.), *Phytophthoras in Forests and Natural Ecosystems. Proceedings of the fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party S07.02.09. General Technical Report PSW-GTR-221*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Albany, CA, pp. 101–115.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F, 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* **184**: 449–456.
- Buée M, Maurice J-P, Zeller B, Andrianarisoa S, Ranger J, Courtecuisse R, Marçais B, Le Tacon F, 2011. Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecology* **4**: 22–31.
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM, 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetic Biology* **30**: 17–32.
- Cooke DEL, Schena L, Cacciola SO, 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* **89**: 13–28.
- Courtecuisse R, Duhem B, 1994. *Guide des champignons de France et d'Europe*. Delachaux & Niestlé.
- Courty P-E, Buée M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault M-P, Uroz S, Garbaye J, 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: new perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* **42**: 679–698.
- Courty PE, Franc A, Pierrat JC, Garbaye J, 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 5792–5801.
- Cox F, Barsoum N, Bidartondo MI, Borja I, Lilleskov E, Nilsson LO, Rautio P, Tubbu K, Vesterdal L, 2010. A leap forward in geographic scale for forest ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* **67**: 200.
- Dalpé Y, 1986. Axenic synthesis of ericoid mycorrhiza in *Vaccinium angustifolium* Ait. By *Oidiodendron* species. *New Phytologist* **103**: 391–396.
- Davison EM, Tay FCS, 2005. How many soil samples are needed to show that *Phytophthora* is absent from sites in the South-west of Western Australia? *Australasian Plant Pathology* **34**: 293–297.
- Dickie IA, Xu B, Koide RT, 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytologist* **156**: 527–535.
- Dray S, Dufour AB, 2007. The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–20.
- Duchauffour P, Bonneau M, 1959. Une nouvelle méthode de dosage du phosphore assimilable dans les sols forestiers. *Bulletin de l'AFES* **41**: 193–198.
- Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460–2461.
- Erwin DC, Ribeiro OK, 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St Paul (Minnesota). 562.
- Fichtner EJ, Lynch SC, Rizzo DM, 2007. Detection, distribution, sporulation, and survival of *Phytophthora ramorum* in a California Redwood-Tanoak forest soil. *Ecology and Epidemiology* **97**: 1366–1375.
- Gardes M, Bruns TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113–118.
- Genney DR, Anderson IC, Alexander JJ, 2006. Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* **170**: 381–390.
- Gómez-Aparicio L, Ibanez B, Serrano MS, De Vita P, Avila JM, Perez-Ramos IM, Garcia LV, Sanchez ME, Maranon T, 2012. Spatial patterns of soil pathogens in declining Mediterranean forests: implications for tree species regeneration. *New Phytologist* **194**: 1014–1024.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ, 2004. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* **432**: 747–750.
- Green J, Bohannan BJM, 2006. Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* **21**: 501–507.
- Hansen E, Delatour D, 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. *Annals of Forest Science* **56**: 539–547.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk PM, Nilsson RH, 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* **25**: 38–47.
- Jansen AE, de Nie HW, 1988. Relations between mycorrhizas and fruitbodies of mycorrhizal fungi in Douglas fir plantations in the Netherlands. *Acta Botanica Neerlandica* **37**: 243–249.
- Jumpponen A, Jones KL, Blair J, 2010. Vertical distribution of fungal communities in tallgrass prairie soil. *Mycologia* **102**: 1027–1041.
- Jung T, Blaschke H, Oßwald W, 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* **49**: 706–718.
- Jung T, Hudler GW, Jensen-Tracy SL, Griffiths HM, Fleischmann F, Oßwald W, 2005. Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist* **19**: 159–166.
- Kauserud H, Kumar S, Brysting AK, Nórdén J, Carlsen T, 2012. High consistency between replicate 454 pyrosequencing analyses of ectomycorrhizal plant root samples. *Mycorrhiza* **22**: 309–315.
- Kjøller R, 2006. Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 214–224.
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F, 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* **102**: 348–364.

- Landeweert R, Leeflang P, Smit E, Kuyper TW, 2005. Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. *Mycorrhiza* 15: 1–6.
- Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR, Taylor DL, Grogan P, 2004. Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 49: 319–332.
- Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Högberg P, Stenlid J, Finlay RD, 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173: 611–620.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Nechwatal J, Oßwald W, 2001. Comparative studies on the fine root status of healthy and declining spruce and beech trees in the Bavarian Alps and occurrence of *Phytophthora* and *Pythium* species. *Forest Pathology* 31: 257–273.
- Nilsson RH, Veldre V, Hartmann M, Unterseher M, Amend A, Bergsten J, Kristiansson E, Ryberg M, Jumpponen A, Abarenkov K, 2010. An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology* 3: 284–287.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J-M, Vilgalys R, 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5544–5550.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H, 2011. *vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.0-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M, 2009. Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424–437.
- Peter M, Ayer F, Egli S, 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycetes sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* 149: 311–325.
- Pickles BJ, Genney DR, Potts JM, Lennon JJ, Anderson IC, Alexander IJ, 2010. Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 186: 755–768.
- R Development Core Team, 2011. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. R version 2.13.1 (2011-07-08). <http://www.R-project.org/>.
- Rinaldi AC, Comadini O, Kuyper TW, 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1–45.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N, 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4: 1340–1351.
- Rosling A, Landeweert R, Lindahl BD, Larsson KH, Kuyper TW, Taylor AFS, Finlay RD, 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159: 775–783.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spougea JL, Levesque AC, Chenb W Fungal Barcoding Consortium, 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.
- Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL, 2012. A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 88: 356–368.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75: 7537–7541.
- Smith AH, 1973. Agaricales and related secotoid gasteromycetes. In: Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS (eds), 1973. *The Fungi – an advanced treatise*, vol. 4B. Academic Press, San Francisco, California.
- Smith SE, Read DJ, 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press, London.
- Taylor AFS, 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244: 19–28.
- Tedersoo L, Koljalg U, Hallenberg N, Larsson KH, 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* 159: 153–165.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME, 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–263.
- Tedersoo L, Bahram M, Jairus T, Bechem E, Chinoya S, Mpumba R, Leal M, Randrianjohany E, Razafindimison S, Sadam A, Naadel T, Kõljalg U, 2011. Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Molecular Ecology* 20: 3071–3080.
- Toljander JF, Eberhardt U, Toljander YK, Paul LR, Taylor AFS, 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170: 873–884.
- Unterseher M, Jumpponen A, Opik M, Tedersoo L, Moora M, Dormann CF, Schnittler M, 2011. Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics – lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology* 20: 275–285.
- Uroz S, Buée M, Murat C, Frey-Klett P, Martin F, 2010. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. *Environmental Microbiology Reports* 2: 281–288.
- Van Der Linde S, Alexander IJ, Anderson IC, 2009. Spatial distribution of sporocarps of stipitate hydroid fungi and their belowground mycelium. *FEMS Microbiology Ecology* 69: 344–352.
- Vettriano A, Jung T, Vannini A, 2008. First report of *Phytophthora cactorum* associated with beech decline in Italy. *Plant Disease* 92: 1708.
- Wallander H, Johansson U, Sterkenburg E, Durling MB, Lindahl B, 2010. Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce. *New Phytologist* 187: 1124–1134.
- Whitcomb S, Stutz JC, 2007. Assessing diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a local community: role of sampling effort and spatial heterogeneity. *Mycorrhiza* 17: 429–437.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.

# **CHAPITRE II. DIVERSITE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES LE LONG DE GRADIENTS D'ALTITUDE**

## **1. Problématique**

Cette étude s'inscrit dans les objectifs du projet BACCARA et vise à tester l'effet de paramètres climatiques (température, précipitations) sur la diversité des communautés microbiennes forestières. La collaboration engagée avec l'équipe de l'INRA de Bordeaux a permis de coordonner l'étude de trois groupes écologiques distincts : les champignons associés aux racines, les champignons de la phyllosphère (habitat de la feuille) et les oomycètes du sol ; et par conséquent de comparer la réponse des communautés fongiques issues de deux habitats très distincts. Le travail sur les communautés de la phyllosphère a fait l'objet de plusieurs publications dans le cadre de la thèse de Tristan Cordier (Cordier, 2012).

Dans le cadre de la cette thèse, les objectifs étaient i) de décrire, en terme de diversité et de structure, les communautés fongiques, en particulier EcM, et d'oomycètes le long de gradients d'altitude géographiquement distincts, ii) d'évaluer les effets relatifs de variables climatiques (températures, précipitations) et édaphiques (C, N, P, C/N, pH) sur ces communautés, et iii) éprouver la méthodologie sur un plus grand nombre de sites pour les oomycètes pathogènes.

## **2. Méthodologie**

Le gradient naturel d'altitude a été utilisé comme proxy des variations climatiques et quatre gradients ont été sélectionnés comme répétition: un gradient pyrénéen échelonné sur 5 sites d'altitude, un gradient alpin de 3 sites, un gradient vosgien de 3 sites, dont celui de Lignéville étudié précédemment, et un gradient italien dans les Apennins de 4 sites (Figure 14).

Le gradient pyrénéen est un site atelier des partenaires de l'UMR BIOGECO (INRA, Bordeaux), le gradient alpin faisait aussi l'objet de recherches dans le cadre du projet BACCARA par les partenaires de l'IRSTEA (Grenoble) et les 3 sites du gradient vosgien ont été sélectionnés en regroupant des informations climatiques (base de données AURHELY) avec des informations forestières.





**Figure 14.** Localisation des sites échantillonnés lors des études le long de gradients d'altitude (croix bleues) et d'un gradient latitudinal (points rouges).

Noter que (i) les trois sites du gradient altitudinal alpin sont très proches, (ii) les quatre sites du gradient d'altitude italien sont très proches et qu'un des sites a été repris pour l'étude sur le gradient latitudinal et (iii) deux sites polonais sont également très proches près de la côte de la Mer Baltique.

Au total, 15 sites d'altitude ont été visités à l'été 2010 pour l'échantillonnage auprès de 15 arbres (trois grappes de cinq arbres). Chaque grappe a constitué un échantillon. Dans la mesure où les conclusions de la première étude n'étaient pas finalisées, les communautés fongiques ont été étudiées à partir du système racinaire, afin de cibler les espèces ectomycorhiziennes, et les communautés d'oomycètes à partir de l'ADN du sol.

L'utilisation des données le long du gradient italien a été remise en cause lors de la phase d'analyse des données pour plusieurs raisons : la différence de traitement (suite à l'échantillonnage) géré par les collègues italiens, le faible gradient thermique, la difficulté d'harmoniser l'estimation des températures entre la France et l'Italie (bases de données différentes) et des données manquantes pour les variables édaphiques italiennes. La grande variabilité de composition entre les communautés fongiques françaises et italiennes observées lors d'analyses préliminaires occasionnait un frein à l'exploration des variables environnementales. De plus, l'étude des oomycètes n'était pas possible pour les sites italiens car déjà en cours par les collaborateurs italiens. Au vu de tous ces éléments, le gradient italien n'a donc pas été inclus dans les analyses finales.

### 3. Résultats

De manière similaire à la première étude, peu d'oomycètes (54 MOTU) ont été détectés par rapport aux champignons. Deux *Phytophthora* et 14 espèces de *Pythium* ont été identifiées : *Phytophthora cactorum* and *Phytophthora* sp1 sont supportés par 32 et 27 séquences respectivement. *P. cactorum* a été détecté sur un site des Alpes et *P. sp1* sur un site des Pyrénées. Cela confirme que l'approche méthodologique pour l'étude des oomycètes des sols forestiers doit être améliorée ou que ce type d'approche est moyennement adapté compte tenu de la richesse, relative faible, en espèce de *Phytophthora*.

Les résultats ont montré que la richesse fongique racinaires et celle plus spécifique des espèces ectomycorhiziennes ne sont pas significativement corrélées ni avec l'altitude, ni avec les variables environnementales testées. Les mêmes conclusions sont valables pour les communautés fongiques de la phyllosphère. De manière remarquable, la richesse du groupe taxonomique des ascomycètes est significativement corrélée de manière positive à la température moyenne annuelle. La composition de la communauté fongique des racines et de la phyllosphère ainsi que la composition de la communauté ectomycorhizienne sont liées au pH et à la température moyenne annuelle. La variance sur les axes de l'AFC est expliquée en grande partie (74%) par le facteur 'gradient'.

Il faut noter que les deux variables climatiques (température moyenne annuelle et précipitations annuelles) étaient corrélées. C'est une des raisons pour laquelle nous avons envisagé une troisième étude, qui vise à contrôler la variable des précipitations pour évaluer l'effet de la température sur les communautés fongiques.

Les données sur *Phytophthora* et *Pythium* étant peu exploitables pour une étude le long de gradient d'altitude et du fait des nombreux résultats sur les champignons associés aux racines et à la phyllosphère, seuls les résultats concernant les champignons le long des gradients français font partie d'une publication intitulée « **Below-ground and above-ground fungal assemblages do not follow similar elevation diversity pattern** » par Counce A, Cordier T, Lengellé J, Defossez E, Vacher C, Robin C, Buée M, Marçais B. L'article a été soumis à PLOS One en septembre 2013.

1 **Below-ground and above-ground fungal assemblages do not follow similar**  
2 **elevational diversity pattern.**

3

4 Aurore Coince<sup>1</sup>, Tristan Cordier<sup>2,3</sup>, Juliette Lengellé<sup>1</sup>, Emmanuel Defosse<sup>4</sup>, Corinne  
5 Vacher<sup>2,3</sup>, Cécile Robin<sup>2,3</sup>, Marc Buée<sup>1,§,\*</sup>, Benoît Marçais<sup>1,§,\*</sup>

6

7 <sup>1</sup> INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine « Interactions Arbres-Microorganismes »,  
8 Labex ARBRE, FR EFABA, 54280 Champenoux, France

9 <sup>2</sup> INRA, BIOGECO, UMR1202, F-33610 Cestas, France

10 <sup>3</sup> Univ. Bordeaux, BIOGECO, UMR1202, F-33400 Talence, France

11 <sup>4</sup> Irstea, UR EMGR Ecosystèmes Montagnards, 2 rue de la Papeterie, 38402 St-Martin-  
12 d'Herès, France

13 <sup>§</sup> authors who equally lead the work

14

15 \* Corresponding authors. Benoît Marçais and Marc Buée, INRA, UMR1136, Route  
16 d'Amance, 54280 CHAMPENOUX, France.

17 Tel: +33 383 39 40 53. Fax: +33 383 39 40 69. E-mail address: marçais@nancy.inra.fr

18 Tel: +33 383 39 40 72. Fax: +33 383 39 40 69. E-mail address: buee@nancy.inra.fr

19

20 **ABSTRACT**

21

22 Fungal diversity along environmental gradients has little been explored in contrast to the  
23 diversity of plants and animals. Hence, environmental factors influencing the composition of  
24 fungal assemblages are still poorly understood. The aim was to determine whether the  
25 richness of telluric and leaf fungal assemblage decreases with elevation, how the composition  
26 is altered with elevation and to investigate potential explanatory variables. High-throughput  
27 sequencing of the rDNA ITS1 region was used to explore root-associated and phyllosphere  
28 fungal assemblages along three elevation gradients in beech forests. The variation of species  
29 richness and assemblage composition were investigated within these two habitats for Dikarya  
30 assemblages, including ectomycorrhizal fungi.

31 Below-ground and above-ground fungal assemblages do not follow similar elevational  
32 diversity pattern. Fungal species richness was not significantly related to neither elevation nor  
33 climatic or edaphic variables, for both below-ground and phyllosphere fungi. The  
34 composition of phyllosphere fungal assemblage was correlated with the mean annual  
35 temperature whereas the composition of below-ground fungal assemblage was primarily  
36 correlated with the soil pH. The ascomycetes and basidiomycetes assemblage compositions  
37 differed in their relation to the temperature and the soil pH. Additionally, the ectomycorrhizal  
38 assemblage related to these variables in a different way compared to the whole fungal root-  
39 associated assemblage.

40 Our results therefore suggest that above and below-ground fungal assemblages are not  
41 controlled by the same environmental variables. It is thus encouraged to investigate these  
42 groups globally and separately in ecological studies to decipher their respective constraints.

43

44 Keywords: diversity, ectomycorrhizal fungi, phyllosphere, temperature, soil pH, 454  
45 pyrosequencing

46

47

48 **INTRODUCTION**

49

50 Despite their major roles in ecosystem functioning, the distribution patterns of fungal  
51 assemblages are poorly understood and few studied have been performed at large  
52 geographical scales [1],[2]. In particular, the environmental factors influencing the richness  
53 and the composition of the microbial assemblages are still poorly known compared to macro-

54 organisms. Climatic factors are usually mentioned to explain macro-organisms distribution  
55 patterns and are important at the global scale. A synthesis of the literature for plants,  
56 vertebrates and invertebrates demonstrated that water variables are usually the best predictors  
57 of species richness below 30°N whereas energy variables (potential evapotranspiration,  
58 temperature) are the best predictors above 30°N [3]. Elevation and latitude gradients are  
59 closely related to several key climatic variables. Thus, these gradients are commonly used  
60 since decades for field experiments because of their great convenience for testing the  
61 correlation between climatic variables and the species distribution [4], [5]. Diversity of  
62 macro-organisms decreases with increasing latitude [6] and depending on the groups, a hump-  
63 shaped distribution or a decrease in species richness with elevation is observed for plants,  
64 vertebrates or invertebrates [7], [8]. These large scale distribution patterns are of special  
65 interest in the context of climate change. Indeed, there are accumulating evidence for a  
66 change in plant community under global warming, in particular along elevation gradient with  
67 a shift in the distribution of plants species which is more pronounced at higher elevations [9],  
68 [10].

69 Microbial communities have been less studied because of the difficulties to adequately  
70 describe them. However, advances in molecular techniques now allow far easier  
71 characterisation of fungal assemblages and better estimation of the fungi species richness.  
72 Nowadays, high-throughput sequence-based technology is recognized as a powerful method  
73 that improves our perception of microorganisms in a variety of environmental conditions and  
74 of habitats [11], [12], [13] and in particular along environmental gradients [14], [15], [16].

75 Recent findings suggest that microbes may not follow the elevational diversity patterns  
76 generally observed for macro-organisms [17], [17] and that other factors may drive the  
77 richness of fungi compared to other organisms, in particular for ectomycorrhizal fungi (EcM)  
78 [13], [19], [20]. However, microbial diversity patterns along elevation gradient are not clear.  
79 Fierer *et al.* (2011) observed no change in bacterial phylotype richness across a gradient  
80 ranging over 3000m [18] while Bryant *et al.* (2008) reported a monotonic decrease of the  
81 bacterial richness with elevation across a gradient ranging 1000m [17]. Data available for  
82 fungal diversity variation along elevation gradient are scant. A recent study, showed no  
83 change of fungal richness with elevation [21], and another study could not conclude of a trend  
84 for fungi although they observed a higher diversity at mid-elevation (850m) for bacterial  
85 assemblages [22]. For mycorrhizal fungi, a majority of the studies concluded about a decrease  
86 of diversity with elevation [23], [24], [25], [15] although a study detected a unimodal  
87 distribution of ectomycorrhizal fungi with diversity peaking at 1500m [26]. Besides the

88 diversity, the composition of fungal assemblages varies with elevation, as has been reported  
89 for fungal assemblages of the beech phyllosphere [14], mycorrhizal fungi [15], [23], [27] and  
90 fungal wood decomposers [21]. Climatic variables may still explain part of these variations in  
91 diversity or composition of the microorganism assemblages. Indeed, the mean annual  
92 temperature and precipitation explained the observed patterns of EcM fungi richness and  
93 assemblage structure along elevation gradients and along the latitudinal gradient [13], [15],  
94 [20]. Finally, the host plant and the soil pH could be the major drivers of microbial  
95 community diversity and composition [15], [17], [20], [23], [28], [29], [30], [31].

96  
97 In this study, we aimed at determining whether the richness of telluric and leaf fungal  
98 assemblage fits to the elevation diversity gradient observed for the majority of organisms i.e.  
99 decreases with elevation. For this purpose, we sampled on elevation gradient in three different  
100 mountainous areas of France focussing on beech forests to alleviate the host effect. We also  
101 studied which environmental variables associated to elevation might influence this richness  
102 and/or the composition of phyllosphere and root-associated fungal assemblages. Climatic  
103 variables (mean annual air temperature and annual precipitation) and edaphic variables (pH,  
104 carbon/nitrogen ratio, carbon (C), nitrogen (N) and phosphorus (P) contents) were selected as  
105 potential explaining variables for the fungal species richness and fungal assemblage  
106 composition along the three elevation gradients. We hypothesized that i) fungal species  
107 richness decreases with increasing elevation and decreasing temperature and ii) fungal  
108 assemblages are more constrained by climatic variables aboveground than belowground.

109

## 110 **MATERIALS AND METHODS**

111

### 112 **Site description and sampling design**

113 The three elevation gradients studied were located in the Vosges, the Alps and the Pyrenees  
114 mountains in France. Forest stands were chosen at three different elevations in the Vosges and  
115 the Alps and at five elevations in the Pyrenees. We selected stands with mature and dominant  
116 (> 50% of the basal area) beech trees (*Fagus sylvatica*). The sampling was permitted by the  
117 Office National des Forêts and the private owner of the St Nicolas stand.

118 For each elevation, three groups of five beeches were selected. The trees were approximately  
119 5 m apart within a group and the distances between each group were approximately 25 m.  
120 Three leaves per tree, from different branches, were sampled between June and July 2010 as  
121 described in [14]. In the same time, three soil cores per tree (approximately 50 cm<sup>3</sup> with 10

122 cm depth) at 1 m from the trunk were sampled.  
123 The leaves were placed in individual plastic bags containing 10 ml of silica gel each (Sigma-  
124 Aldrich, St. Louis, MO) to ensure that they completely dry within a few hours. The plastic  
125 bags were stored at 16°C until DNA extraction. For a given tree, the three soil cores were  
126 pooled and stored at 4°C until processing. The entire root system was sorted out from the soil  
127 with a 5-mm-mesh sieve and immediately frozen. Then, the root systems were gently washed  
128 with tap water to remove soil particles. The big roots (over 3mm diameter) were discarded  
129 and the fine-roots (including residual rhizospheric soil) were pooled, lyophilized and ground  
130 10 sec in a ball mill. Soil analyses were carried out by the Laboratoire d'Analyse des Sols  
131 d'Arras (<http://www5.lille.inra.fr/las>) for pH (water method), total C (NF ISO 10694), total N  
132 (NF ISO 13878) and P contents [32]. The mean annual temperature and the annual  
133 precipitation at each elevation site were obtained from the AURHELY database for the 1971-  
134 2001 period (Analysis Using the Relief for Hydrometeorology) [33] (Table 1).

135

#### 136 **DNA isolation and 454-pyrosequencing**

137 For leaf samples, DNA isolation, PCR amplification, amplicon library preparation and 454-  
138 pyrosequencing were executed as described previously [14].

139 For below-ground samples, the total genomic DNA extraction isolation was carried out using  
140 the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) for root samples (50 mg of the fine root powder per  
141 sample). For each DNA sample, approximately 15 mg of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)  
142 was added to the samples to neutralize putative PCR-inhibitors. Manufacturers' instructions  
143 were then followed. The Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) region was targeted as a  
144 recognized DNA barcode for fungal identification [34]. The fungal ITS region was amplified  
145 from root and leaf metagenomic DNA with the forward ITS1F  
146 (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) [35] and reverse ITS2 primers  
147 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) [36].

148 For 454 Titanium pyrosequencing of multiplexed amplicons, the forward primer was adjoined  
149 a 4-bases multiplexed identifier and an adaptor A (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG),  
150 whereas the reverse primer was adjoined the adaptor B  
151 (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG) before amplification. The amplification of the  
152 rDNA ITS1 for samples from the same plot was done with the same tag-encoded primer set.  
153 PCR mix preparation was done in 20 µL with final concentration of 0.4 X enzyme buffer,  
154 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1.12 mg/mL BSA, 0.2 mM dNTP each, 0.2 µM non-tagged primer (ITS6 and  
155 ITS4) or 0.4mM tagged primer (ITS1F and ITS2), 0.05 U/µL Taq polymerase (Sigma). DNA



156 extracts from root samples were diluted 100 times. The GeneAmp system 9700 was used with  
157 50% ramp for the production of tagged amplicons. The program was as follow: 5 min at 95°C,  
158 35 cycles of 30 sec at 95°C, 40 sec at 53°C and 45 sec at 72°C, and a final step 7 min at 72°C.  
159 The PCR reactions were done for each sample separately (15 sites x 3 plots x 5 trees) and  
160 amplicons from the same plot were then pooled. Amplicon purifications were done on a  
161 MultiScreen<sub>HTS</sub> PCR Plate MSNU030 (Millipore Corporation) and consisted of two washings  
162 with 100 µL H<sub>2</sub>O and final resuspension in 40 µL H<sub>2</sub>O. The concentration of each sample was  
163 measured three times with the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer and an equimolar  
164 pooling was done. In total, we obtained independent libraries corresponding to 33 foliar, and  
165 33 root tagged samples, sequenced with three independent runs. The 454 pyrosequencing was  
166 done at the Génoscope (Evry, France). The raw data were deposited on the Sequence Read  
167 Archive website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under the study accession ERP003510.  
168 The three libraries are under the following experiment accessions: ERX280868 (alias  
169 TCA.AQN\_GOTS\_G0YLLAW02) for the root samples, ERX280870 (alias  
170 TCA.AQN\_FOTS\_GYUGVSB04) for the phyllosphere samples from the Pyrenees, and  
171 ERX280871 (alias TCA.AQN\_HOTS\_G2Q8WDE03) for the phyllosphere samples from the  
172 Alps and the Vosges.

173

## 174 **Bioinformatics**

175 The sequences were sorted into different files according to their multiplex identifier (MID)  
176 using sfffile software, with no mismatches allowed for the MIDs, which were then removed.  
177 The sequences were cleaned (trimming and denoising) with trim.flows in Mothur version  
178 1.26.0 with the default parameters [37].

179 The ITS1 was extracted using Fungal ITS extractor version 2 [38]. After extraction of the  
180 ITS1 region, the sequences were filtered based on a minimal length of 100 bp. Out of a total  
181 of 370 449 sequences, 228 104 (61.6%), were retained for downstream analyses. In order to  
182 reduce redundancy, Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) were generated after  
183 six successive clusterings with Uclust version 3.0 (Usearch version 6.0.152) [39] at 97% of  
184 similarity and with the parameter iddef = 2. The first clustering included all the sequences and  
185 subsequent clusterings were conducted with the batch of consensus sequences from the  
186 previous clustering. The taxonomic assignation of a consensus sequence generated by Uclust,  
187 was done against a cured GenBank database (July 2012) obtained with the following request  
188 “Eukaryota[organism] AND ribosomal NOT fungal sp. NOT Ectomycorrhiza of NOT uncultu  
189 red NOT unknown NOT mRNA NOT environmental sample NOT mycorrhiza of NOT endo

190 mycorrhiza of NOT Homo sapiens NOT unidentified” in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. The  
191 Basic Local Alignment Search Tool algorithm version 2.2.23 [40], with the filter turned off  
192 (i.e. segments of the query sequence that have low compositional complexity were not  
193 masked off). This option allowed sequence matching that could not be possible when the filter  
194 was on probably because of pyrosequencing overestimation of homopolymers. Ten BLAST  
195 hits were considered when available. The phylum name was extracted from the NCBI  
196 taxonomy corresponding to the GenInfo identifier (GI number). An additional BLASTN was  
197 carried out online for MOTUs with no hit found. This allowed determining the phylum for  
198 some of them. For the assignment at the genus level, only blast results for which identity > 90  
199 % and e-value  $e^{-50}$  were considered. The percentage of identity, given in the BLASTN result,  
200 was the ratio of the length of identical bases over the length of the alignment. To increase the  
201 robustness of the assignment, the MOTUs were assigned to the genus if at least eight blast  
202 hits were congruent with each other for the genus name or all should be congruent when  
203 fewer hits were available. This threshold was chosen arbitrarily but avoided the choice of the  
204 best blast hit which may be misleading. The species name was determined only for MOTUs  
205 with a genus assignment and at an identity equal or greater to the internal ITS1 similarity  
206 among phylum retrieved from the Supplementary Table 3 of [41]. The ITS1 variability for  
207 each phylum was calculated as the mean ITS1 intra-specific variability within each phylum  
208 weighted by the number of sequences (29502 sequences in all in [41]) and were as follow:  
209 Ascomycota, 2.88%; Basidiomycota, 4.98%; Chytridiomycota, 7.81%; Glomeromycota,  
210 9.48%; and Zygomycota, 4.13%. Some synonyms were corrected using the online Species  
211 Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org>). The MOTUs were assigned to the species level  
212 if at least six blast hits were congruent with each other for the species name or all should be  
213 congruent when fewer hits were available. The threshold was again chosen arbitrarily. The  
214 MOTUs taxonomically assigned to a same species or matching to a same GI number at > 90  
215 % identity and for an e-value  $e^{-45}$ , were subsequently grouped together reducing further the  
216 total number of MOTUs. Many MOTUs were then discarded according to the following  
217 criteria: 1) non-fungal MOTUs ; 2) MOTUs supported by only one sequence (singletons) or  
218 3) MOTUs with no hit found in the additional BLASTN and supported by less than 10  
219 sequences.

220

## 221 **Statistical analyses**

222 A principal component analysis was used for selecting environmental variables that were not  
223 collinear.

224 The MOTUs were categorised in functional groups such as ectomycorrhizal fungi,  
225 saprophytes or pathogens based on the laboratory knowledge of the scientific literature.  
226 Precisely, EcM fungi were determined in accordance to the literature [42], [43], [44]. Several  
227 assemblages were studied: first, fungal assemblages from a particular habitat (phyllosphere or  
228 fine-roots), then ascomycetes and basidiomycetes from these two habitats, and finally the  
229 EcM fungi from the root samples (see Table 4).

230 The phyllosphere fungal species were defined as the species inhabiting both the surface and  
231 the interior of leaves [12] and an assemblage was defined as the set of all fungal species  
232 present in a particular habitat such as phyllosphere or root at a given time [45]. More  
233 precisely, assemblages were defined as the addition of all fungal molecular operational  
234 taxonomic units (MOTUs, a reasonable proxy for species) detected. The richness was the  
235 estimated number of MOTUs per sample and the composition referred to the identity of the  
236 MOTUs constituting the assemblage. Richness was used as diversity measure because other  
237 diversity indexes rely on the abundance of each species and the number of sequences is not  
238 assumed to be a measure of abundance [46]. In order to estimate the richness in each sample  
239 with a similar sequencing depth (similar sequencing effort), rarefaction curves were computed  
240 for each sample (i.e. each plot) with the rarefy function of the vegan R package [47]. Before  
241 rarefaction, one sequence per MOTU was randomly discarded to recreate singletons in the  
242 assemblage [48]. Hence, the richness per sample was estimated at a sequencing depth of 1400  
243 and 500 sequences per sample for the phyllosphere and the roots assemblages respectively.  
244 We made the hypothesis that the proportion of ascomycetes and basidiomycetes within the  
245 unknown MOTUs was the same as within the assigned MOTUs. The estimated richness of  
246 groups such as ascomycetes, basidiomycetes, or EcM fungi was calculated as follow for each  
247 sample: number of MOTUs belonging to the group / total number of MOTUs assigned at the  
248 phylum level \* 100 \* estimated fungal richness of the sample. The list of the MOTUs with  
249 indication of the phylum and ecological mode for EcM fungi is given in Supplementary  
250 Table.

251 The correspondence analysis (CoA) was used to discriminate the samples based on their  
252 assemblage composition. The abundance matrix was rarefied at sequencing depth mentioned  
253 above with the rrarefy function of the vegan R package [47] and then transformed into a  
254 presence/absence matrix. From this binary matrix, the MOTUs present in less than three plots  
255 were discarded to prevent distortion of the CoA by the rare MOTUs. The CoA was done with  
256 the dudi.coa function of the ade4 R package [49] with default parameters. The coordinates on  
257 the two first axes were used as a measure of assemblage composition for subsequent statistical

258 tests. The percentage variation explained by the axis and the percentage of contribution of  
259 each MOTUs or each sample to the axis were retrieved from the results of the function CA  
260 from the FactoMineR package [50].

261 The mixed linear model was used to test for significant relationships between richness or  
262 assemblage composition and the selected environmental variables. Interactions were not  
263 included in the models because they were not significant. The lme function available from the  
264 nlme R package [51] allowed setting the elevation gradient (Alps, Vosges or Pyrenees) as a  
265 random factor with the elevation site nested within the gradient. The significance level was  
266 set at 0.05 for every test.

267

## 268 **RESULTS**

269

### 270 **Selection of environmental variables**

271 The environmental variables (mean annual temperature, annual rain, soil carbon content, soil  
272 nitrogen content, carbon:nitrogen ratio, and soil phosphorus content) were significantly  
273 correlated to the elevation with the exception of the soil pH ( $F_{1,31} = 2.70$ ,  $p\text{-value} = 0.110$ ).  
274 Moreover, the environmental variables were significantly related to each others except the soil  
275 pH and the C:N ratio. The soil pH was weakly but significantly related to the C:N ratio ( $R^2 =$   
276  $0.1$ ,  $F_{1,31} = 4.20$ ,  $p = 0.049$ ) only. The C:N ratio was also related to the soil phosphorus  
277 content ( $R^2 = 0.18$ ,  $F_{1,31} = 8.10$ ,  $p = 0.008$ ). Furthermore, the two first axis of the PCA on  
278 environmental variables explained 54.3 % and 21.3%, respectively (Supplemental Figure 1).  
279 Nitrogen, phosphorus, temperature and rain were the main contributors to the first axis with  
280 approximately 20% each whereas C:N ratio and pH contributed to the second axis for 55%  
281 and 34% respectively. Therefore, only two variables, temperature and pH, were tested for  
282 explaining fungal assemblage diversity and composition in the mixed linear models (Table 4).

283

### 284 **Analysis of pyrosequencing data**

285 There were 228 104 sequences that passed the quality filters and the mean number of  
286 sequences per sample after the cleaning steps was 4 544 and 2 368 for the leaf and root  
287 samples respectively.

288 There were 4 855 MOTUs after all the clustering steps. 35.5 % of the MOTUs were  
289 singletons within the entire dataset and the number of singletons per sample was significantly  
290 correlated to the number of MOTUs per sample ( $F_{1,64} = 157.50$ ,  $p\text{-value} < 0.001$ ,  $r^2 = 0.707$ ).  
291 Singletons were discarded leaving 3 018 non-singleton MOTUs for the analysis (Table 2).

292 Respectively 49.3%, 28.8% and 21.9% of the MOTUs were found in only one, in two or in

293 the three gradients. 29.0% were found in only one of the 11 elevation sites and 1.5% was  
294 found in all the 11 sites. 55.6% were found in at least three plots out of the 33 investigated.  
295 There was a significant positive correlation between the log of abundance and the frequency  
296 i.e. the number of plots in which the MOTUs were present ( $F_{1,3016} = 5721.0$ , p-value <0.001,  
297  $r^2 = 0.655$ ).

298 Respectively 10.1%, 57.2%, 15.3%, and 17.4% of the non singleton MOTUs were  
299 unassigned, assigned only at the phylum, the genus or the species level (Table 2).  
300 Remarkably, several abundant MOTUs matched no hit in Genbank following the automated  
301 procedure but could be assigned online (Table 3). Altogether, Dikarya represented 86.4 % of  
302 the MOTUs and 96.1% of the phylum-assigned MOTUs.

303  
304 A high diversity of fungal genera was found as respectively 165 and 212 genera were counted  
305 in the phyllosphere and root-associated assemblages. The most diverse genera were  
306 *Cryptococcus* (25 MOTUs) and *Taphrina* (22 MOTUs) in the phyllosphere whereas *Russula*  
307 and *Cortinarius* represented 55 and 50 MOTUs respectively in the root samples. The  
308 phyllosphere harboured a higher proportion of ascomycetes compared to the root system  
309 (mean of 77.2% and 51.0% respectively for n=33,  $t_{64} = 18.96$ , p-value < 0.001). This was well  
310 reflected by the twenty most abundant MOTUs from each habitat because there were 18  
311 ascomycetes for the phyllosphere and nine in the root dataset (Table 3). Among the 140  
312 MOTUs shared by the leaf and root habitats, 60 were supported by only one sequence in at  
313 least one of the two habitats, meaning that they were not equivalently represented in both  
314 habitats. In total, 306 MOTUs were classified as EcM fungi of which 289 (94.4%) were  
315 basidiomycetes.

316

### 317 **Fungal richness**

318 The estimated richness per plot for a sequencing depth of 1400 sequences per sample ranged  
319 from 103 to 199 MOTUs in leaf samples (81 to 154 ascomycetes and 12 to 55  
320 basidiomycetes). The estimated richness ranged from 88 to 157 MOTUs in root samples for a  
321 sequencing depth of 500 sequences per sample (36 to 80 ascomycetes, 31 to 66  
322 basidiomycetes, and 8 to 64 EcM MOTUs).

323 For most of the assemblages considered, no significant pattern of richness was found along  
324 the elevation gradient ( $-0.78 < t < 2.08$  ;  $0.076 < p\text{-value} < 0.638$  ; results not shown) and no  
325 relationship was found between richness and mean annual temperature except for the root  
326 ascomycete richness ( $t = -3.47$ , p-value = 0.010) (Figure 1; Table 4). Additionally, whatever

327 the assemblage considered, no significant relationship was found between richness the  
328 environmental variables (soil pH, C, N, C:N, P ; data shown only for pH ; Table 4).

329 The gradient random factor was a very different source of variability depending on the fungal  
330 assemblage. While leaf assemblages richness significantly varied according to the gradient  
331 (45.5 - 68.7 % of the total variance, Table 4, likelihood ratio of 6.6 - 7.8 with  $0.005 < p\text{-value}$   
332  $< 0.060$ ), root assemblage richness did not (likelihood ratio of about  $10^{-8}$ ,  $p\text{-value}$  over 0.999,  
333 Table 4). The richness of leaf fungal assemblage as well as ascomycetes and basidiomycetes  
334 assemblage was higher in the Pyrenees compared to the Alps and the Vosges (Figure 1). For  
335 the global root-associated fungal community most of the variation of richness was induced by  
336 the site random factor (likelihood ratio of 6.9 - 11.4 with  $p\text{-value} < 0.010$ ). The within-site  
337 variation between the group of 5 trees represented between 28 and 44% of the total variation  
338 depending on the assemblage considered (Table 4).

339

#### 340 **Microbial composition along the gradients**

341 Binary matrices for the CoA were retrieved for each of the studied communities, i.e.  
342 phyllosphere MOTUs ( $n = 512$ ), root-associated MOTUs ( $n = 472$ ), and root-associated EcM  
343 MOTUs ( $n = 120$ ). Relatively little variation in the assemblage composition existed between  
344 the 3 plots of a site. Indeed, the residual variance that represents the intra plot variance was  
345 usually low (Table 4) and the three plots from a same site were usually close to each other on  
346 the CoA (Figure 2A, B). The three plots from the two sites in the Pyrenees which had strong  
347 positive values on the second axis were Lourdes and Laveyron, the two lowest elevation sites  
348 from the Pyrenees gradient (Table 1).

349 The phyllosphere assemblages of the Pyrenees were very different from those of the Alps and  
350 the Vosges, which were quite similar to each other (Figure 2A). Indeed, the percentage of  
351 variance explained by the gradient for these phyllosphere assemblages was high for both on  
352 the first and the second axis of the CoA (77.3 % and 92.6% respectively).

353 The first axes of the CoA for the phyllosphere assemblages were significantly related to the  
354 mean annual temperature but not with soil pH (Table 4, Figure 3A). The sites were clearly  
355 distributed on the first and second axis according to the elevation, with low elevation sites  
356 having high values on the first axis and low values on the second axis, in particular for the  
357 Pyrenees (Figure 2A). Among leaf MOTUs that had strong contribution on the first axis of the  
358 CoA (over 0.9%), there was mainly none assigned MOTU. Ascomycetes and basidiomycetes  
359 phyllosphere assemblages had a similar relationship to mean annual temperature and soil pH  
360 and were both very similar to the entire phyllosphere fungal assemblage considering the two

361 first axis of the CoA (Table 4).

362 The pattern observed for root-associated assemblages was different of the phyllosphere  
363 assemblages with in particular a major role of the pH (Figure 3B and Table 4). Concerning  
364 the root assemblage, the first axis of the CoA was significantly related to the soil pH only  
365 with plots with high value of pH having high CoA axis 1 values (Figure 3B). The second axis  
366 was related to temperature (Table 4). Strong contributors to axis 1 with contribution over 0.9  
367 were *Cenococcum* sp1 and *Meliniomyces* sp1. *Cenococcum* sp1, *Cadophora* sp1, *Agrocybe*  
368 *erebia*, and *Tomentella pilosa* were among the MOTUs only found in plots where soil pH was  
369 over 5 (7 plots out of 33). It should be noted that *Hypocreales*, like *Acremonium* spp.,  
370 *Chaunopycnis* spp., *Hypocrea* spp., *Pochonia* spp. or *Paecilomyces* spp. were found in most  
371 of the sites, which had a pH range of 4.0 to 6.4 and thus did not showed any significant  
372 relationship with soil pH (result not shown).

373 The first axis of the CoA for the root-associated EcM fungi was significantly related to  
374 temperature and soil pH and the second axis to the soil pH (Table 4). The three EcM MOTUs  
375 which contributed the most on the first axis were *Cenococcum* sp1 (4.13%), *Russula* sp5  
376 (3.66%), *Meliniomyces* sp1 (3.26%), *Boletus erythropus* (3.01%). There were EcM fungi only  
377 detected in the two warmer sites ( $\geq 12.0^{\circ}\text{C}$ ) e.g. *Russula solaris* and *Russula ingwa*. On the  
378 contrary, *Melanogaster* sp2 and *Clavulina amethystina* were only detected in the two colder  
379 sites ( $\leq 7.5^{\circ}\text{C}$ ). Twenty-three *Russula* spp, 16 *Cortinarius* spp, 14 *Hypochrea* spp, 10  
380 *Cryptococcus* spp., eight *Lactarius* spp., five *Boletus* spp., and other species from other  
381 genera were not found in sites where the soil pH  $> 5$ .

## 382 383 **DISCUSSION**

384  
385 Phyllosphere and root-associated fungal assemblages were investigated across three elevation  
386 gradients. The fungal richness was not related to any environmental variable tested for most  
387 of the studied fungal assemblage except the root ascomycete assemblages for which richness  
388 increased with mean annual temperature. The composition of the assemblage showed  
389 different relationship to environmental variables for root and phyllosphere assemblages.  
390 While the phyllosphere fungal assemblage was more specifically related to mean annual  
391 temperature, the fine-root fungal assemblage was more related to soil pH.

### 392 393 **Richness does not decline along elevation gradients for most fungal assemblage**

394 As expected, a high fungal richness was observed above as well as below-ground. Microbial  
395 richness has been re-evaluated upwards since the development of high-throughput sequencing

396 [11], [12], [52], [53].

397 For plants and animals, the typical elevation gradient of species richness observed consists in  
398 a lower richness in high-elevation sites compared to low or mid-elevation sites [7], [8]. This  
399 common trend was reported for symbiotic microorganisms like the arbuscular mycorrhizal  
400 fungi [24], [25] or the ectomycorrhizal fungi [15]. However, our results showed no  
401 relationship between richness and elevation for most of the studied fungal assemblages.  
402 Additionally, no correlation was found between richness and elevation for particular  
403 subgroups of fungi such as EcM. A possible explanation for this absence of trend could be a  
404 too little elevation range in our study. Indeed, our highest sites were at 1533 m whereas the  
405 above-mentioned studies include sites over 1550 m. However, this does not appear very likely  
406 with an overall elevation range of 180 to 1533 m. Moreover, a significant relation was found  
407 between elevation and the root ascomycetes assemblage. There are studies reporting no  
408 pattern for microbial assemblage along elevation gradient or an increase in assemblage  
409 richness with elevation. The EcM richness showed no variation along the Savadkuh gradient  
410 which encompasses sites over 2000m [15]. An increased richness of macromycetes with  
411 elevation was recently observed and a peak of richness at 1100m was reported for EcM  
412 macromycetes [26].

413 The mean annual temperature and precipitation were reported to drive species richness along  
414 elevation gradients [15], [20]. However, as the richness was not correlated with elevation in  
415 this study for most assemblage and in particular for EcM assemblage, it did not correlate with  
416 climatic and edaphic variables that covaried with elevation. However, the richness of  
417 ascomycetes assemblages did increase with increasing mean annual temperature. Maybe the  
418 different fungal groups are too heterogeneous to be pooled into one assemblage and pooling  
419 could blur the relationship of assemblage richness with environmental gradients. Furthermore,  
420 the fungal richness was not correlated to the soil pH. This finding corroborates similar  
421 observations of a significant relationship between the soil pH and the fungal richness [29].

422 Bias in determining the diversity of microbial community may impede the detection of a clear  
423 pattern of richness along the gradients. Indeed, Haegeman et al. (2013) stressed the problem  
424 of the many rare species in estimating diversity and suggest the use of diversity index [54].  
425 However, diversity index rely on the relative abundance of species which is distorted during  
426 the molecular experimental process. For this reason, the richness was estimated according to  
427 rarefaction curves. Hence, the richness estimation remains an actual challenge with the 454  
428 pyrosequencing technique and innovations are required to biologically control the relation  
429 between sequence abundance and species abundance or to statistically take into account for



430 the bias.

431

## 432 **Assemblage composition along the elevation gradients and environmental factors**

433

### 434 **Above-ground**

435 Our results showed that mean annual temperature could be of main importance in structuring  
436 the phyllosphere fungal assemblages at large geographic scale. Some recent studies showed  
437 that these fungal assemblages are spatially structured, from the regional scale [12] to the  
438 single tree canopy scale [55], [52] and along elevation gradient [56]. Although these fungi are  
439 often generalist with a cosmopolitan distribution, these assemblages are structured by both  
440 abiotic factors such as the mean annual temperature [14], rainfall [56] and biotic factors, such  
441 as the host genotype [52]. The difference in fungal assemblages between, in one hand, the  
442 Pyrenees and, in another hand, the Alps and the Vosges could be the result of beech  
443 population differences. Such genetic variation along elevation gradient is already documented  
444 for forest trees (reviewed in [57]), including European beech [58], [59], [60]. Another  
445 explanation for such a difference could be explained by the fact that European Beech is at his  
446 southern margin in the Pyrenees  
447 ([http://www.euforgen.org/fileadmin/www.euforgen.org/Documents/Maps/PDF/Fagus\\_sylvatica.pdf](http://www.euforgen.org/fileadmin/www.euforgen.org/Documents/Maps/PDF/Fagus_sylvatica.pdf)).  
448 The fitness of species at their margin is known to be usually weaker because of  
449 constraining environment, acting as selective pressures [61]. Such assumptions could be  
450 tested by extending the sampling in other parts of Europe, including Northern margin (UK  
451 and Finland) and eastern margin (Turkey and Ukraine).

452

### 453 **Below-ground**

454 Several recent studies showed that the belowground fungal assemblage composition varies  
455 along elevation gradient [15], [23], [24], [27], [62]. In this study, the composition first  
456 correlated with the soil pH and secondly with the temperature, which varied negatively with  
457 elevation.

458 Soil characteristics were also reported as drivers of the microbial assemblage. Indeed, our  
459 results showed that fungal assemblage composition was strongly related to soil pH, which  
460 confirmed previous reports [29], [63]. As the soil pH of our sites was between 4.0 and 6.4,  
461 acidiline species were expected. Remarkably, several Hyprocreales were detected whereas  
462 this family was mentioned to be absent from soil with pH < 5.5 [29]. Although, the global  
463 prevalence of Cenococcum spp. is well illustrated [64], [65], [66], [67], the MOTU

464 *Cenococcum* sp1 was restricted to plots where the pH was above 5. However, this apparent  
465 ubiquity may be the result of cryptic species and it is now recognized that *C. geophilum* for  
466 example is a species complex [68].

467 Intriguingly, the root-associated ascomycete composition was correlated with the mean  
468 annual temperature although the root-associated basidiomycete composition was not. This  
469 suggests that the two groups could behave differently.

470 As the EcM fungi in the dataset were mostly basidiomycetes (88%), it could be expected that  
471 the EcM assemblage would behave as the basidiomycete assemblage. Interestingly, the  
472 pattern of correlation was not congruent between basidiomycetes and EcM fungi. This could  
473 be explained by the high number of basidiomycetes that are not EcM fungi. The composition  
474 of the root basidiomycete assemblage as a whole was only correlated to the pH whereas the  
475 composition of EcM assemblage in particular was correlated to both temperature and pH. The  
476 relation with temperature for the EcM assemblage could be possibly mediated by the effect of  
477 climatic variable on the vegetation through root status and turnover for example. Indeed, it is  
478 known that a major structuring factor of EcM assemblage is the host family [69]. Beech-  
479 dominated stand were explicitly chosen to avoid this biotic effect due to the symbiotic nature  
480 of the EcM and investigate abiotic variables. It confirms that temperature is an important  
481 factor in shaping EcM assemblage composition [15], [20].

482 As plants, fungi can be used as indicator for particular habitat type but it is not widely  
483 documented so far due to the still ongoing description of fungal diversity and distribution.  
484 However, large-scale sampling and in depth sequencing would favour such practice as the  
485 measure of an indicative value, such as the positions on CoA, will accumulate for Fungi.

486

### 487 **Comparison of above and below-ground assemblage trends**

488 It should be noted that in this study, above and belowground assemblage richnesses were not  
489 directly comparable as the type (fine-roots vs leaves) and the size of the samples used to  
490 describe each assemblage were not equivalent. However, our results suggested that above-  
491 ground and below-ground fungal assemblage compositions are not driven by the same factors.  
492 While the phyllosphere assemblage seemed only related to a climatic variable, the  
493 belowground assemblage was related to both edaphic and climatic variables. The  
494 phyllosphere assemblage is known to be dominated by ascomycetes [12], [70], [71] whereas  
495 both ascomycetes and basidiomycetes contribute to the belowground fungal assemblage in a  
496 similar proportion. A clear difference in composition was observed for leaf and root habitats  
497 although they shared some MOTUs. This was partly expected as aerial and belowground

498 fungal assemblages experience different environmental constraints and may exert different  
499 ecological functions. As a parallel, substrate-driven selection may explained the distinct  
500 bacterial communities found in the phyllosphere and associated to the roots [72].

501

## 502 **CONCLUSION**

503

504 Different fungal assemblage appeared to respond differently to environmental gradient.  
505 Indeed, only the root ascomycete assemblage richness was observed to increase with  
506 increasing temperature. Also, the phyllosphere fungal assemblage composition was mainly  
507 correlated with a climatic variable although it was not as straightforward for root-associated  
508 fungi which also responded to the soil pH. The richness pattern of a variety of fungal  
509 assemblages along environmental gradients has still to be described in different conditions to  
510 be understood. Particularly, fine analysis of root or leaf-associated ascomycetes and  
511 basidiomycetes assemblages is encouraged as they seem not to be related to the same  
512 environmental variables.

513

## 514 **ACKNOWLEDGEMENTS**

515

516 The authors thank Xavier Capdevielle, Cyrille Bach, Olivier Caël, for their help in sampling,  
517 Corinne Cruaud and Frederick Gavory from the Génoscope (Evry) for the 454 sequencing of  
518 the samples and bioinformatic assistance, and Nicolas Cichocki, Lydie Renard and Olivier  
519 Fabreguettes for their technical help. Francis Martin is acknowledged for providing  
520 bioinformatic resources and Benjamin Petre and Georges Kunstler are thanked for comments  
521 on the manuscript.

522

523 **REFERENCES**

- 524
- 525 1. Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, et al. (2004) Spatial scaling of  
526 microbial eukaryote diversity. *Nature* 432: 747–750.
- 527 2. Fierer N (2008) Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space  
528 and time. In: *Assessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to*  
529 *Organisms and Genomes and Back*. K. Zengler (editor). ASM Press, Washington DC pp  
530 95–115.
- 531 3. Hawkins BA, Field R, Cornell HV, Currie DJ, Guégan JF, Kaufman DM, et al. (2003)  
532 Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* 84:  
533 3105–3117.
- 534 4. Körner C (2007) The use of “altitude” in ecological research. *Trends Ecol Evol* 22:  
535 569–574.
- 536 5. McCain CM, Grytnes J-A (2010) Elevational gradients in species richness. In:  
537 *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 1–10.
- 538 6. Gaston KJ (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature* 405: 220–227.
- 539 7. Rahbek C (1995) The elevational gradient of species richness: a uniform pattern?  
540 *Ecography* 18: 200–205.
- 541 8. Nogués-Bravo D, Araújo MB, Romdal T, Rahbek C (2008) Scale effects and human  
542 impact on the elevational species richness gradients. *Nature* 453: 216–219.
- 543 9. Lenoir J, Gégout JC, Marquet PA, de Ruffray P, Brisse H (2008) A significant upward  
544 shift in plant species optimum elevation during the 20th century. *Science* 320: 1768–  
545 1771.
- 546 10. Bertrand R, Lenoir J, Piedallu C, Riofrío-Dillon G, Ruffray P, Vidal C, et al. (2011)  
547 Changes in plant community composition lag behind climate warming in lowland  
548 forests. *Nature* 479: 517–520.
- 549 11. Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F (2009) 454  
550 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity.  
551 *New Phytol* 184: 449–456.
- 552 12. Jumpponen A, Jones KL (2009) Massively parallel 454 sequencing indicates  
553 hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere.  
554 *New Phytol* 184: 438–448.
- 555 13. Tedersoo L, Nara K. (2010). General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in  
556 ectomycorrhizal fungi. *New Phytol* 185:351–354.
- 557 14. Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau M-L, Vacher C  
558 (2012) The composition of phyllosphere fungal assemblages of European  
559 beech (*Fagus sylvatica* L.) varies significantly along an elevation gradient. *New*  
560 *Phytol* 196: 510–519.
- 561 15. Bahram M, Pölme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo L (2012) Regional and local patterns  
562 of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal  
563 gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol* 193: 465–73.
- 564 16. Davey ML, Heegaard E, Halvorsen R, Kauserud H, Ohlson M (2013) Amplicon-  
565 pyrosequencing-based detection of compositional shifts in bryophyte-associated  
566 fungal communities along an elevation gradient. *Mol Ecol* 22: 368–83.
- 567 17. Bryant JA, Lamanna C, Morlon H, Kerkhoff AJ, Enquist BJ, Green JL (2008) Microbes  
568 on mountainsides: contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity.  
569 *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 11505–11511.

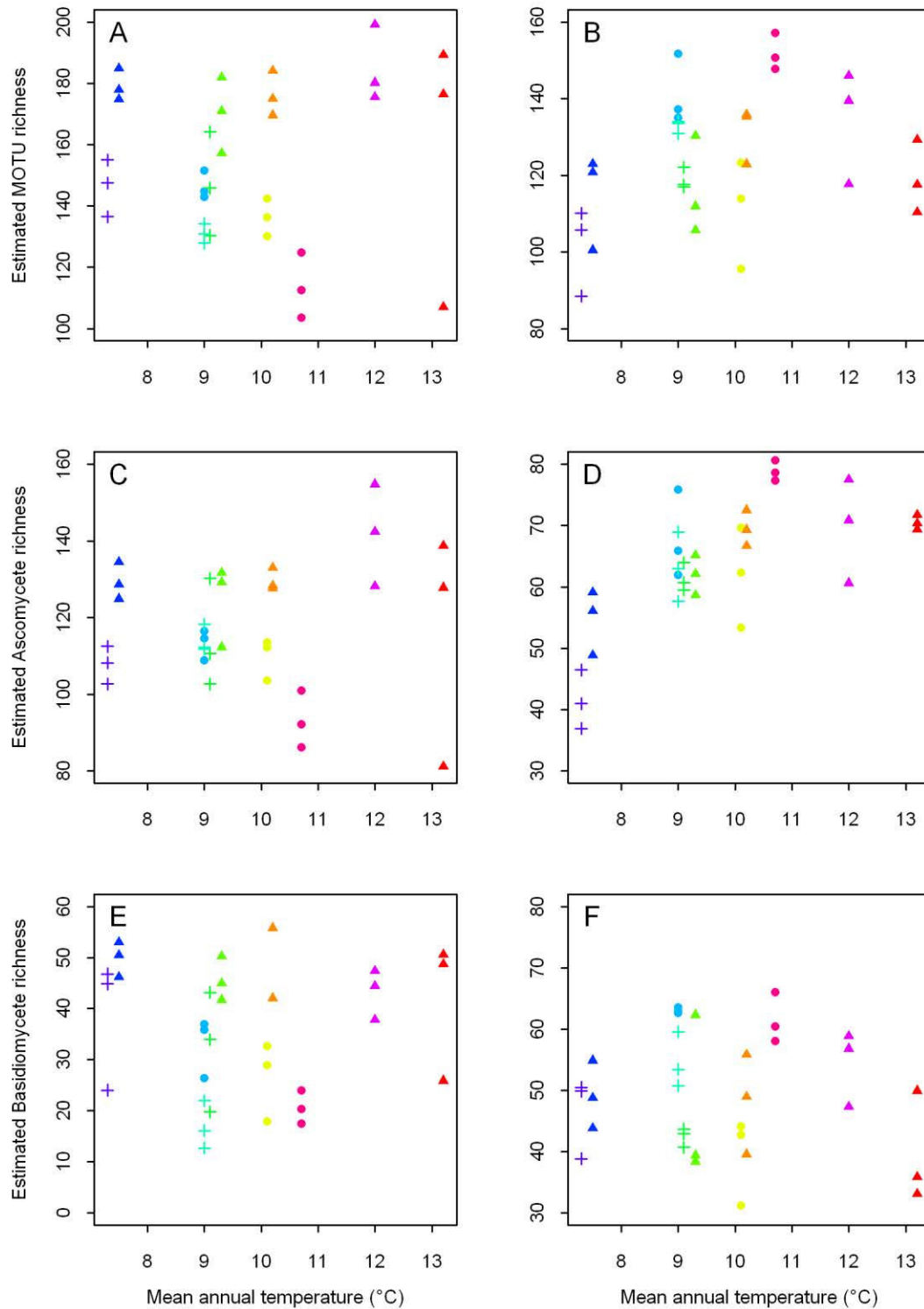
- 570 18. Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR, Knight R (2011)  
571 Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals.  
572 Ecology 92: 797–804.
- 573 19. Kennedy PG, Matheny PB, Ryberg KM, Henkel TW, Uehling JK, Smith ME (2012)  
574 Scaling up: examining the macroecology of ectomycorrhizal fungi. Mol Ecol 21:  
575 4151–4154.
- 576 20. Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, et al. (2012)  
577 Towards global patterns in the diversity and community structure of  
578 ectomycorrhizal fungi. Mol Ecol 21: 4160–4170.
- 579 21. Meier CL, Rapp J, Bowers RM, Silman M, Fierer N (2010) Fungal growth on a common  
580 wood substrate across a tropical elevation gradient: temperature sensitivity,  
581 community composition, and potential for above-ground decomposition. Soil Biol  
582 Biochem 42: 1083–1090.
- 583 22. Meng H, Li K, Nie M, Wan JR, Quan ZX, Fang CM, et al. (2013) Responses of bacterial  
584 and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of  
585 China. Appl Microbiol Biotechnol 97: 2219–2230.
- 586 23. Kernaghan G, Harper KA. (2001). Community structure of ectomycorrhizal fungi  
587 across an alpine/subalpine ecotone. Ecography 24: 181–188.
- 588 24. Wu B, Hogetsu T, Isobe K, Ishii R (2007) Community structure of arbuscular  
589 mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of  
590 Mount Fuji. Mycorrhiza 17: 495–506.
- 591 25. Lugo MA, Ferrero M, Menoyo E, Estévez MC, Siñeriz F, Anton A (2008) Arbuscular  
592 mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria diversity along an altitudinal gradient in  
593 south american puna grassland. Microb Ecol 55: 705–713.
- 594 26. Gómez-Hernández M, Williams-Linera G, Guevara R, Lodge DJ (2012) Patterns of  
595 macromycete community assemblage along an elevation gradient: options for fungal  
596 gradient and metacommunity analyses. Biodivers Conserv 21: 2247–2268.
- 597 27. Gorzelak MA, Hambleton S, Massicotte HB (2012) Community structure of ericoid  
598 mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an  
599 elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. Fungal ecology 5: 36–45.
- 600 28. Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC (2009) Global patterns  
601 in belowground communities. Ecol Lett 12: 1238–49.
- 602 29. Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, et al. (2010) Soil  
603 bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. ISME J 4:  
604 1340–1351.
- 605 30. Buée M, Maurice JP, Zeller B, Andrianarisoa S, Ranger J, Courtecuisse R, et al. (2011)  
606 Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in  
607 a French temperate forest stand. Fungal Ecol 4: 22–31.
- 608 31. Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M, Whiteley AS (2011) The bacterial  
609 biogeography of British soils. Environ Microbiol 13: 1642–1654.
- 610 32. Duchaufour P, Bonneau M, 1959. Une nouvelle méthode de dosage du phosphore  
611 assimilable dans les sols forestiers. Bulletin de l'AFES 41: 193–198.
- 612 33. Benichou P, Le Breton O. (1987) Prise en compte de la topographie pour la  
613 cartographie de champs pluviométriques statistiques. La Météorologie 7, 19  
614 Boulognes-Billancourt DMN pp 23-35.
- 615 34. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spougea JL, Levesque AC, et al. (2012)  
616 Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA  
617 barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci USA 109: 6241–6246.

- 618 35. Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for  
619 basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol*  
620 2: 113–118.
- 621 36. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, (1990) Amplification and direct sequencing of  
622 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ,  
623 White TJ (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic  
624 Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- 625 37. Schloss P D, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. (2009)  
626 Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported  
627 software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ*  
628 *Microbiol* 75: 7537–7541.
- 629 38. Nilsson RH, Veldre V, Hartmann M, Unterseher M, Amend A, Bergsten J, et al. (2010)  
630 An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from  
631 fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular  
632 ecology. *Fungal Ecol* 3: 284–287.
- 633 39. Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.  
634 *Bioinformatics* 26: 2460–2461.
- 635 40. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment  
636 search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.
- 637 41. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H (2008)  
638 Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the International  
639 Sequence Databases and its implications for molecular species identification. *Evol*  
640 *Bioinform* 4: 193–201.
- 641 42. Rinaldi AC, Comadini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity:  
642 separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers* 33: 1–45.
- 643 43. Smith SE, Read D (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press: London.
- 644 44. Tedersoo L, May TW, Smith ME (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global  
645 diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20: 217–  
646 263.
- 647 45. Ricklefs RE, Miller GL (2000) *Ecology*. Fourth Edition. W.H. Freeman and Company.
- 648 46. Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454  
649 pyrosequencing: does read abundance count? *Mol Ecol* 19: 5555–5565.
- 650 47. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, et al. (2011)  
651 *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-2. [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=vegan)  
652 [project.org/package=vegan](http://CRAN.R-project.org/package=vegan)
- 653 48. Unterseher, M, Schnittler M (2010) Species richness analysis and ITS rDNA  
654 phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus*  
655 *sylvatica*). *Fungal Ecol* 3: 366–378.
- 656 49. Dray S, Dufour AB. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for  
657 ecologists. *J Stat Softw* 22: 1–20.
- 658 50. Husson F, Josse J, Le S, Mazet J. (2012). *FactoMineR: Multivariate Exploratory Data*  
659 *Analysis and Data Mining with R*. R package version 1.18. [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR)  
660 [project.org/package=FactoMineR](http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR)
- 661 51. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, the R Development Core Team (2012) *nlme:*  
662 *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-103. R  
663 Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical*  
664 *computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-  
665 07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- 666  
667

- 668 52. Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Desprez-Loustau M-L, Vacher C (2012) Spatial  
669 variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over  
670 geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecol* 5: 509–  
671 520.
- 672 53. Coince A, Caël O, Bach C, Lengellé J, Cruaud C, Gavory F, et al. (2013) Below-ground  
673 fine-scale distribution and soil versus fine root detection of fungal and soil oomycete  
674 communities in a French beech forest. *Fungal Ecol* 6: 223–235.
- 675 54. Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J, Weitz JS (2013) Robust  
676 estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J*. doi:  
677 10.1038/ismej.2013.10.
- 678 55. Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR (2009) Diversity and distribution of fungal  
679 foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycol Res* 113: 1003–1015.
- 680 56. Zimmerman NB, Vitousek PM (2012) Fungal endophyte communities reflect  
681 environmental structuring across a Hawaiian landscape. *Proc Natl Acad Sci U S A*.  
682 109:13022–13027.
- 683 57. Ohsawa T, Ide Y (2008) Global patterns of genetic variation in plant species along  
684 vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecol Biogeogr* 17: 152–163.
- 685 58. Löchelt S, Franke, A. (1995). Bestimmung der genetischen Konstitution von Buchen-  
686 Beständen (*Fagus sylvatica* L.) entlang eines Hohentranssektes von Freiburg auf den  
687 Schauinsland. *Silvae Genet* 44: 312-318.
- 688 59. Sander T, König S, Rothe GM, Janssen A, Weisgerber H (2000) Genetic variation of  
689 European beech (*Fagus sylvatica* L.) along an altitudinal transect at Mount  
690 Vogelsberg in Hesse, Germany. *Mol Ecol* 9: 1349–61.
- 691 60. Jump AS, Hunt JM, Peñuelas J (2007) Climate relationships of growth and  
692 establishment across the altitudinal range of *Fagus sylvatica* in the Montseny  
693 Mountains, northeast Spain. *Ecoscience* 14:507-518.
- 694 61. Angert AL, Schemske DW (2005) The evolution of species' distributions: reciprocal  
695 transplants across the elevation ranges of *Mimulus cardinalis* and *M. lewisii*.  
696 *Evolution* 59: 1671–1684.
- 697 62. Osono T, Hirose D (2009) Altitudinal distribution of microfungi associated with  
698 *Betula ermanii* leaf litter on Mt. Rishiri, northern Japan. *Can J Microbiol* 55: 783–789.
- 699 63. Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N (2009) Pyrosequencing-based assessment  
700 of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale.  
701 *Appl Environ Microbiol* 75: 5111–5120.
- 702 64. Pigott CD (1982) Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. in dry  
703 soils. *New Phytol* 92: 513–517.
- 704 65. BuéeM, Vairelles D, Garbaye J (2005) Year-round monitoring of diversity and  
705 potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus*  
706 *sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15: 235–245.
- 707 66. Dickie IA (2007) Host preference, niches and fungal diversity. *New Phytol* 174: 225–  
708 228.
- 709 67. Matsuda PY, Hayakawa H, Ito S (2009) Local and microscale distributions of  
710 *Cenococcum geophilum* in soils of coastal pine forests. *Fungal Ecol* 2: 31–35.
- 711 68. Douhan GW, Hury KL, Douhan LI (2007) Significant diversity and potential  
712 problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum*  
713 *geophilum* species complex. *Mycologia* 99: 812–819.
- 714 69. Ishida T, Nara K, Hogetsu T (2007) Host effects on ectomycorrhizal fungal  
715 communities: insight from eight host species in mixed conifer-broad leaf forests.  
716 *New Phytol* 174: 430–440.

- 717 70. Arnold AE, Lutzoni F (2007) Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are  
718 tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* 88: 541–549.
- 719 71. Arfi Y, Buée M, Marchand C, Levasseur A, Record E (2012) Multiple markers  
720 pyrosequencing reveals highly diverse and host specific fungal communities on the  
721 mangrove trees *A. marina* and *R. stylosa*. *FEMS Microbiol Ecol* 79: 433–444.
- 722 72. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P  
723 (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant*  
724 *Biol* 64: 807–38.  
725  
726

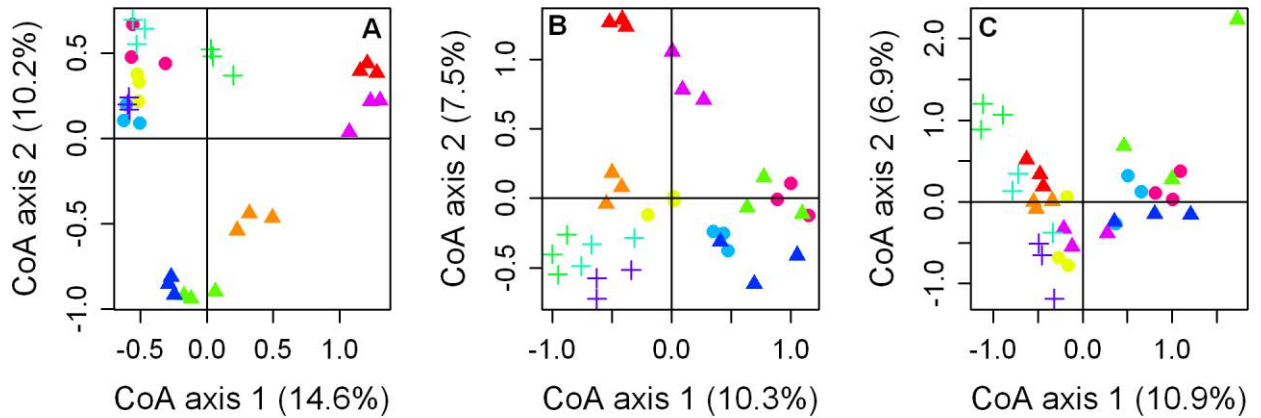




727  
728

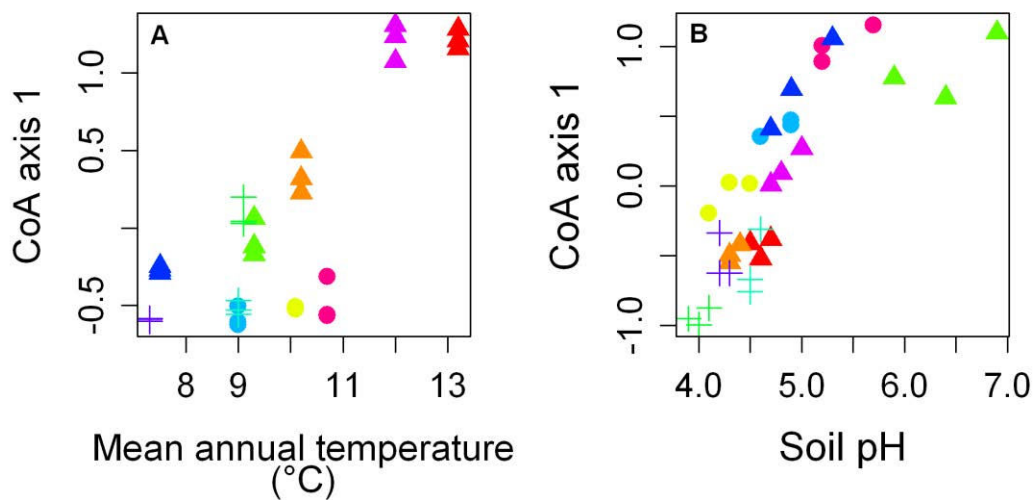
729 **Figure 1. Relationships between richness and mean annual temperature.** Fungal  
730 richness from the phyllosphere (A, C, E) or associated to the fine-roots (B, D, F), either total  
731 richness (A, B), Ascomycetes richness (C, D) or Basidiomycete richness (E, F). The richness  
732 was estimated from rarefaction at a sequencing depth of 1400 and 500 sequences per leaf and  
733 root samples, respectively. Samples corresponded to the Alps (closed dots), the Pyrenees  
734 (filled triangles) or the Vosges (plus sign).

735  
736



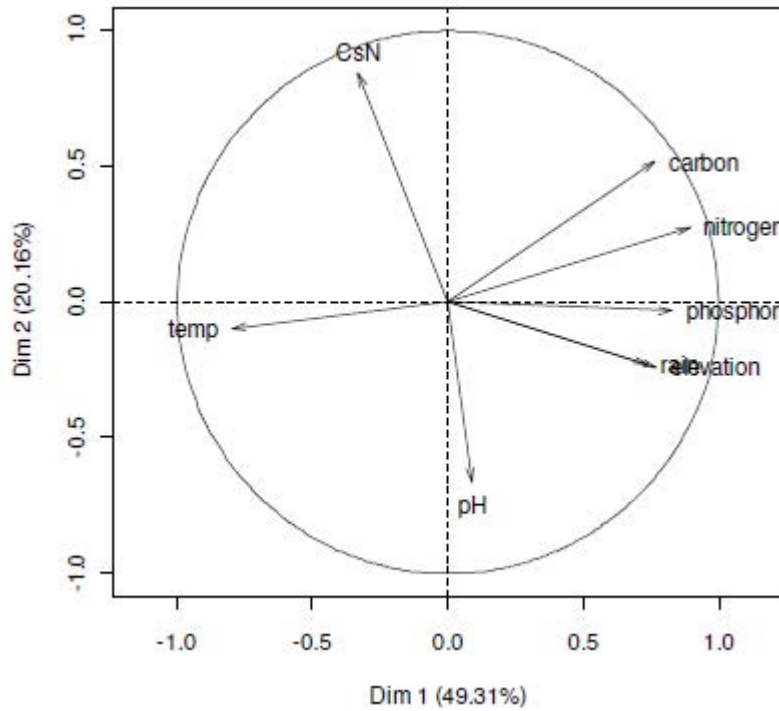
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744

**Figure 2.** Correspondence analysis representing the distribution of the samples according to the presence/absence of MOTUs. There were 512 phyllosphere-associated MOTUs (A), 472 root-associated MOTUs (B), and 120 root-associated EcM MOTUs (C). Samples were from the Alps (closed dots), the Pyrenees (filled triangles) or the Vosges (plus sign). Percentage of variance into brackets.



745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752

**Figure 3.** Significant relationships between a measure of composition and environmental variables. The leaf fungal composition was related to the mean annual temperature (A) whereas the root-associated fungal assemblage was primarily related to the soil pH (B). The measure of composition was the axis values on the correspondence analysis (see Figure 2). Samples were from the Alps (closed dots), the Pyrenees (filled triangles) or the Vosges (plus sign).



753  
754 **Figure S1. Principal component analysis of the environmental variables.** Note that the  
755 annual precipitation and elevation are overlapped.  
756

757  
758 **Table 1. Environmental data of the three altitudinal gradients.** The element contents  
759 in soil and the pH were averaged per site for clarity purpose but were measured in the three  
760 plots per site.  
761

Gradient	Site name	Elevation (m)	Longitude	Latitude	Mean annual temperature (°C)	Annual precipitation (mm)	Soil pH (water)	Carbon content (g/kg)	Nitrogen content (g/kg)	Phosphorus content (g/kg)
Alpes	Vizille	750	E 5°47'	N 45°04'	10.7	965.8	5.4	52.83	3.51	0.21
Alpes	Montsec	1100	E 5°48'	N 45°04'	10.1	1001.7	4.3	116.67	7.02	0.32
Alpes	Pic de l'Oeilley	1450	E 5°50'	N 45°05'	9.00	1148.3	4.8	76.27	4.46	0.2
Pyrenees	Laveyron	131	W 00°13'	N 43°45'	13.1	918.7	4.6	20.60	1.15	0.05
Pyrenees	Lourdes	488	W 00°05'	N 43°05'	12.0	1504.5	4.8	48.63	3.73	0.25
Pyrenees	Arras-Sireix	833	W 00°08'	N 42°58'	10.2	1306.0	4.3	114.33	5.97	0.27
Pyrenees	Haugarou	1190	W 00°12'	N 43°00'	9.3	1434.0	6.4	98.87	6.19	0.16
Pyrenees	Lienz	1533	E 00°04'	N 42°53'	7.5	1465.1	5.0	60.97	4.47	0.34
Vosges	Lignéville	380	E 5°59'	N 48°07'	9.1	976.3	4.0	53.27	2.75	0.13
Vosges	St Nicolas	550	E 6°56'	N 47°44'	9.0	1485.8	4.5	117.00	6.54	0.25
Vosges	Guebwiller	1180	E 7°02'	N 47°55'	7.3	1672.4	4.2	113.33	7.75	0.33

762  
763

764  
765  
766  
767

**Table 2. Number of sequences and number of MOTUs obtained for the different habitats.**

	Combined dataset (66 samples)	Leaf samples (33 samples)	Root samples (33 samples)
<b>Total number of 454 reads</b>	370 449	248 299	122 150
<b>Number of quality sequences</b>	228 104	149 946	78 158
<b>Range of sequences per sample</b>	552 - 15 830	1 506 - 15 830	552 - 3 622
<b>Range of sequences per site</b>	-	5 691 - 30 380	4 716 - 10 040
<b>Number of MOTUs<sup>1</sup></b>	4 855	2 224	2 771
<b>Number of nonsingletons<sup>2</sup></b>	3 018	1 457	1 701
<b>Taxonomic-level assignation of the nonsingletons</b>			
Phylum only	1 725	967	813
Genus only	525	143	415
Species	462	168	343
Unknown	306	179	130
<b>Phylum-level repartition of the nonsingletons</b>			
Ascomycota	1 672	958	799
Basidiomycota	935	320	667
Zygomycota	97	0	97
Other or incertain fungal lineages	8	0	8
Unknown	306	179	130
<b>Ecological mode</b>			
EcM <sup>3</sup>	306	0	306
Other or unknown	2 712	1 457	1 395

768  
769  
770

<sup>1</sup> Molecular Operational Taxonomic Unit (97% similarity); <sup>2</sup> MOTUs supported by two sequences at least within the combined dataset; <sup>3</sup>including putative EcM fungi

771  
772  
773

**Table 3. The twenty most abundant MOTUs per habitat.**

Habitat	MOTU	Phylum	Lifestyle*	Abundance <sup>1</sup>	Frequency <sup>2</sup>	GI number	Best BLAST hit	Identity	E-value	CS1 <sup>3</sup>	CS2 <sup>3</sup>	
Leaves	MOTU1	Ascomycota		14064	33		No hit found			-0.024	0.094	
	Hymenoscyphus sp1	Ascomycota	ERM	10265	31	198241572	Articulospora tetracladia	96.2	2.00E-65	-0.215	0.028	
	MOTU2	Ascomycota		6386	23	28826194	Taphrina aff. virginica	92.3	3.00E-09	-0.600	0.188	
	MOTU4	Ascomycota		5281	16	393827468	Collophora hispanica	87.3	4.00E-08	0.810	-0.029	
	Aureobasidium sp1	Ascomycota		4925	33	7208764	Aureobasidium pullulans	92.8	5.00E-51	-0.024	0.094	
	MOTU6	Ascomycota		4305	13	33694303	Lalaria inosiphila	94.0	3.00E-15	-0.340	-0.733	
	Taphrina carpini	Ascomycota	pathogen	4252	32	33694304	Taphrina carpini	100.0	3.00E-92	-0.150	0.051	
	Taphrina sp1	Ascomycota	pathogen	4095	33	33694304	Taphrina carpini	97.1	4.00E-73	-0.024	0.094	
	MOTU8	Ascomycota		3590	32		No hit found			-0.010	0.009	
	MOTU9	Basidiomycota		3408	31	161172108	Cryptococcus skinneri	100.0	2.00E-12	-0.215	0.028	
	MOTU10	Ascomycota		3294	18	33694306	Lalaria veronirambellii	92.5	2.00E-10	0.463	-0.518	
	MOTU13	Ascomycota		2223	6	383290939	Articulospora tetracladia	91.4	3.00E-46	-0.860	0.774	
	MOTU14	Basidiomycota		2219	30	227284160	Cryptococcus magnus	100.0	1.00E-07	0.091	0.047	
	MOTU15	Ascomycota		2191	29	349733584	Ascomycota sp.	95.1	5.00E-14	-0.350	0.027	
	MOTU16	Ascomycota		2161	3	33694303	Lalaria inosiphila	85.8	5.00E-20	-0.916	0.378	
	MOTU17	Ascomycota		2048	31	40882367	Venturia hanliniana	97.0	7.00E-50	0.065	0.053	
	MOTU18	Ascomycota		1688	9	365822582	Helotiales sp.	90.7	6.00E-41	-0.088	-0.812	
	MOTU20	Ascomycota		1456	12	38564481	Taphrina bullata	100.0	5.00E-14	-0.409	-0.538	
	MOTU21	Ascomycota		1412	15		No hit found			1.313	0.293	
	MOTU22	Ascomycota		1322	13	198241572	Articulospora tetracladia	90.3	4.00E-36	-0.625	0.726	
	Roots	MOTU12	Ascomycota		2982	23	283482179	Root associated fungus	100.0	6.00E-60	-0.644	0.205
		MOTU5	Basidiomycota		2761	32	306850987	Cryptococcus sp.	92.7	2.00E-47	-0.162	-0.109
Mortierella sp1		Zygomycota	saprobe	2519	33	109390554	Mortierella humilis	100.0	3.00E-83	-0.149	0.033	
Cryptosporiopsis melanigena		Ascomycota	endophyte	2475	22	323435745	Cryptosporiopsis cf. melanigena	99.4	3.00E-86	0.691	-0.089	
Xerocomus pruinatus		Basidiomycota	EcM	2415	28	308055594	Xerocomus pruinatus	100.0	1.00E-121	-0.417	-0.299	
Russula ochroleuca		Basidiomycota	EcM	1835	16	308055384	Russula ochroleuca	100.0	1.00E-106	-0.500	0.071	
MOTU23		Ascomycota		1299	25	148633592	Neonectria sp.	100.0	4.00E-69	0.446	0.403	
Lactarius sp1		Basidiomycota	EcM	1236	23	308055302	Lactarius subdulcis	94.1	1.00E-64	-0.468	0.142	
MOTU24		Basidiomycota		1180	28	148250319	Cryptococcus podzolicus	97.9	6.00E-37	-0.482	0.174	
Penicillium daleae		Ascomycota	saprobe	890	22	312434544	Penicillium sp.	99.4	1.00E-88	-0.376	0.494	
MOTU36		Ascomycota		875	16	5852291	Ericoid mycorrhizal	93.5	2.00E-53	0.360	0.097	
Tricholoma sp7		Basidiomycota	EcM	860	29		No hit found			0.152	0.120	
MOTU39		Ascomycota		780	28	339959136	Chaetosphaerales sp.	99.4	4.00E-79	-0.320	-0.418	
Mortierella sp2		Zygomycota	saprobe	777	22	117571267	Mortierella sp.	100.0	1.00E-75	-0.628	-0.383	
Dermea sp1		Ascomycota	pathogen	694	14	6478324	Dermea viburni	92.2	3.00E-52	-0.338	1.049	
MOTU7		Zygomycota		690	33	325516895	Mortierella horticola	92.3	9.00E-28	0.007	0.007	
MOTU46		Ascomycota		682	24	148734709	Cryptosporiopsis ericae	92.3	2.00E-41	0.403	0.006	
Trichosporon porosum	Basidiomycota	saprobe	667	24	209976391	Trichosporon sp.	100.0	1.00E-59	0.004	0.357		
MOTU48	Basidiomycota		626	15	308055392	Russula ochroleuca	91.1	3.00E-37	-0.801	-0.393		
MOTU49	Ascomycota		616	26	307591808	Helotiales sp.	90.5	3.00E-37	0.305	0.246		

\* known or putative lifestyle; ERM: ericoid mycorrhiza; EcM : ectomycorrhiza  
<sup>1</sup> total number of sequences ; <sup>2</sup> number of plots in which the MOTU was present (max=33) ; <sup>3</sup> position on the two first axis of the Correspondance Analysis (see Figure 2A and B)

774  
775  
776

777  
778  
779  
780  
781  
782

**Table 4. Relationships between potential factors affecting fungal richness and composition above and below-ground.** T-values (p-values) of the linear mixed model are presented. The measure of the community composition was the values on the correspondence analyses (see Figure 2). Significant p-values in bold.

	Standard deviation ***				
	Mean annual temperature	Soil pH	Gradient	Site	Residual
	<b>Rarefied richness*</b>				
Leaf MOTUs	-1.56 (0.162)	-1.17 (0.257)	25.43 (68.7)	5.08 (2.7)	16.39 (28.5)
Leaf Ascomycetes	-0.44 (0.674)	-0.61 (0.647)	12.40 (45.5)	6.09 (11.0)	12.12 (43.5)
Leaf Basidiomycetes	-1.88 (0.089)	-0.92 (0.366)	12.45 (66.7)	3.22 (4.5)	8.19 (28.9)
Roots MOTUs**	1.10 (0.309)	-0.64 (0.528)	0.003 (0)	14.78 (68.9)	9.94 (31.1)
Roots Ascomycetes	<b>3.28 (0.014)</b>	0.61 (0.547)	2.11 (6.6)	5.92 (51.7)	5.32 (41.7)
Roots Basidiomycetes**	-0.32 (0.757)	0.01 (0.991)	0.001 (0)	7.78 (55.3)	7.00 (44.7)
Roots EcM	0.20 (0.845)	-0.38 (0.706)	0.0006 (0)	5.16 (59.0)	4.30 (41.0)
	<b>MOTUs composition CoA Axis1</b>				
Leaf MOTUs	<b>5.93 (&lt;0.001)</b>	-0.96 (0.347)	0.44 (77.3)	0.22 (19.3)	0.09 (3.4)
Leaf Ascomycetes	<b>7.38 (&lt;0.001)</b>	-1.28 (0.215)	0.48 (87.6)	0.16 (9.2)	0.09 (3.2)
Leaf Basidiomycetes	<b>4.77 (0.002)</b>	0.42 (0.676)	0.46 (64.7)	0.30 (28.4)	0.15 (6.9)
Roots MOTUs	-1.87 (0.104)	<b>6.17 (&lt;0.001)</b>	0.47 (74.0)	0.25 (20.6)	0.13 (5.4)
Roots Ascomycetes	<b>6.20 (&lt;0.001)</b>	<b>-8.79 (&lt;0.001)</b>	0.48 (88.5)	0.12 (5.3)	0.13 (6.2)
Roots Basidiomycetes	-1.14 (0.290)	<b>4.70 (&lt;0.001)</b>	0.37 (46.7)	0.34 (40.9)	0.19 (12.4)
Roots EcM	-2.86 (0.025)	<b>6.82 (&lt;0.001)</b>	0.44 (69.4)	0.19 (13.0)	0.22 (17.6)
	<b>MOTUs composition CoA Axis2</b>				
Leaf MOTUs	<b>7.27 (&lt;0.001)</b>	<b>-2.77 (0.012)</b>	0.56 (92.6)	0.15 (6.2)	0.06 (1.2)
Leaf Ascomycetes	<b>6.74 (&lt;0.001)</b>	<b>-2.58 (0.017)</b>	0.51 (88.1)	0.17 (9.8)	0.08 (2.0)
Leaf Basidiomycetes	<b>-3.05 (0.019)</b>	0.37 (0.716)	0.62 (81.6)	0.23 (11.3)	0.18 (7.2)
Roots MOTUs	<b>9.13 (&lt;0.001)</b>	-1.05 (0.307)	0.18 (49.5)	0.14 (29.3)	0.12 (21.2)
Roots Ascomycetes	<b>6.08 (&lt;0.001)</b>	<b>2.61 (0.016)</b>	0.10 (12.2)	0.21 (54.7)	0.17 (33.1)
Roots Basidiomycetes	0.45 (0.667)	<b>3.91 (&lt;0.001)</b>	0.39 (29.2)	0.52 (50.8)	0.33 (20.0)
Roots EcM	0.32 (0.760)	<b>2.38 (0.027)</b>	4.10 <sup>-5</sup> (0)	0.55 (69.5)	0.36 (30.5)

\* Estimated richness at 1400, 500 and 500 sequences per plot for leaf, roots and soil samples respectively  
 \*\* No interaction between temperature and soil pH included in the model  
 \*\*\* Standard deviations associated with the gradient and site nested within gradient random factors (% of the total random plus residual variance explained)

783  
784  
785  
786  
787

# CHAPITRE III. DIVERSITE ET STRUCTURE DES COMMUNAUTES FONGIQUES ET OOMYCETES LE LONG D'UN GRADIENT LATITUDINAL EUROPEEN

## 1. Problématique

La problématique des changements globaux requiert, en pré-requis, de connaître la réponse des communautés fongiques aux variations climatiques, notamment à la température. De plus, de récentes études avancent l'idée que le gradient général de diversité observé en écologie serait l'inverse pour les champignons mycorrhiziens de celui que l'on connaît pour les autres organismes (Tedersoo & Nara, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2012). Cette hypothèse restant à confirmer, et de manière complémentaire à l'étude précédente, cette étude se donne pour objectifs de i) décrire, en terme de diversité et de structure, les communautés fongique et d'oomycètes le long d'un gradient latitudinal européen et ii) étudier l'effet de la température sur ces communautés.

## 2. Méthodologie

Trente et une parcelles dominées par le hêtre ont été sélectionnées en milieu tempéré (Figure 14). Une attention particulière a été portée sur le choix des sites, de façon à ce que les variables 'température' et 'précipitations' ne soient pas corrélées. Suite aux conclusions de l'étude pilote, les racines n'ont pas été considérées et le sol, prélevé sur 20 cm de profondeur, a été utilisé comme substitut pour décrire les communautés fongiques telluriques et ectomycorhiziennes. Le même design expérimental que l'étude précédente (3 grappes de 5 arbres) a été suivi mais la variabilité intrasite n'a pas été prise en compte, c'est-à-dire que chacun des sites correspondait à un échantillon.

Malheureusement, malgré de nouvelles mises au point de protocole et l'utilisation de nouveaux couples d'amorces, les tentatives d'amplification des oomycètes n'ont pas complètement abouti lors de l'étude sur gradient latitudinal et aucun échantillon n'a donc été envoyé pour séquençage.

### 3. Résultats

Concernant les champignons, les résultats préliminaires montrent que la richesse fongique et ectomycorhizienne diminue avec le pH du sol. Par contre, la richesse fongique et la richesse en espèces ectomycorhiziennes ne sont corrélées ni aux précipitations, ni à la température moyenne annuelle.

L'analyse factorielle des correspondances a montré que les communautés sont structurées géographiquement. En effet, comme cela a pu être rapporté pour d'autres organismes telles que les plantes, les communautés fongiques d'une même région géographique se sont révélées plus semblables que des communautés provenant de sites distants. La composition des communautés fongiques serait liée à la fois au pH et aux variables climatiques. Des résultats similaires ont été trouvés pour les communautés ectomycorhiziennes.

Des analyses complémentaires sont prévues avant publication afin d'explorer la réponse des différents groupes taxonomiques (ascomycètes, basidiomycètes) aux variables climatiques.

Ces résultats déjà obtenus sont détaillés et discutés sous la forme d'un manuscrit en préparation intitulé « **Fungi along a latitudinal gradient of Beech forests in Europe** ».



## **Fungi along a latitudinal gradient of Beech forests in Europe**

Aurore Coince<sup>1</sup>, Ana María Rincón Herranz<sup>2</sup>, Marianna Stradaoli<sup>3</sup>, Ana-Maria Vettraino<sup>3</sup>, Anna Zolciak<sup>4</sup>, Johanna Boberg<sup>5</sup>, Jan Stenlid<sup>5</sup>, Juan Carlos Santos-Gonzalez<sup>6</sup>, Roger Finlay<sup>6</sup>, Marc Buée<sup>1,§</sup> \*, Benoît Marçais<sup>1,§</sup> \*

<sup>1</sup> INRA, UMR 1136 INRA Université de Lorraine « Interactions Arbres-Microorganismes », Labex ARBRE, FR EFABA, 54280 Champenoux, France

<sup>2</sup> Department of Plant Physiology and Ecology, Instituto de Recursos Naturales, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115-bis, E-28006 Madrid, Spain

<sup>3</sup> Department of Plant Protection, University of Tuscia, Via S. Camillo de Lellis, Viterbo 01100, Italy

<sup>4</sup> Forest Research Institute, Sękocin Stary, Braci Leśnej 3, PL-05-090 Raszyn

<sup>5</sup> BioCenter, Department of Forest Mycology and Plant Pathology, Swedish University of Agricultural Sciences, PO Box 7026, SE-750 07 Uppsala, Sweden

<sup>6</sup> Department of Forest Mycology and Pathology, Uppsala BioCenter, SLU, P.O. Box 7026, 75007, Uppsala, Sweden.

<sup>§</sup> These authors equally lead the work

\* Corresponding authors. Benoît Marçais and Marc Buée, INRA, UMR1136, Route d'Amance, 54280 CHAMPENOUX, France.

Tel: +33 383 39 40 53. Fax: +33 383 39 40 69. E-mail address: [marcais@nancy.inra.fr](mailto:marcais@nancy.inra.fr)

Tel: +33 383 39 40 72. Fax: +33 383 39 40 69. E-mail address: [buee@nancy.inra.fr](mailto:buee@nancy.inra.fr)

## ABSTRACT

The biogeographical patterns of fungal assemblages have been under-investigated regarding their broad distribution and their essential function in ecosystems. Thus, the environmental factors driving the diversity and the composition of the fungal assemblages at the continental scale are still to be determined. In this study, we investigated the assemblages of fungi, and particularly the ectomycorrhizal fungi, along a European latitudinal gradient of beech forests. The latitudinal gradient was displaying a temperature gradient. The richness of the fungal assemblage did not correlate with climatic variables whereas the richness of mycorrhizal assemblage positively correlated with the mean annual temperature. The composition of the fungal and mycorrhizal assemblages correlated with soil pH and mean annual temperature. Additional studies would be required under other host tree species for example.

Keywords: latitudinal gradient, temperature, ectomycorrhizal fungi, soil, *Fagus sylvatica*, pyrosequencing

## INTRODUCTION

Best knowledge of organism relationships with all components of their environment provides theoretical bases of ecology, including niche concept, community assembly and species evolution (Wiens *et al.* 2010). The knowledge of ecological patterns and processes involved is also required for applied ecology and predictions in a changing environment (Chave, 2013). The magnitude of fungal community seems to be huge (Hawksworth, 2001; Hibbett *et al.* 2011) and although these organisms play major roles in ecosystem functioning worldwide (Hättenschwiler *et al.* 2005), their distribution patterns are poorly understood. In forest ecosystems, the distribution of fungi is influenced by host partners and their geographic origin (Tedersoo *et al.* 2013). However, very few studies have been performed at large geographical scales so far (Green *et al.*, 2004; Fierer *et al.*, 2009). A general trend in ecology is a decline in species diversity with increasing latitude (Hillebrand 2004). However, most studies are based on macroorganisms and the models for bacterial or fungal assemblages are unclear, probably because of the technical constraints linked to the study of these microscopic organisms. Nevertheless, the recent explosion of molecular technologies has greatly stimulated recent studies on fungal diversity, niche partitioning, spatial variability and functional traits. So, there are arguments for a cosmopolitan distribution of microorganisms, which would exhibit no or only weak latitudinal diversity gradient (Fenchel & Finlay 2004). This assertion is supported by results on soil bacteria (Fierer & Jackson 2006) and on ectomycorrhizal fungal (Timling *et al.*, 2012) communities. However, a decline of planktonic marine bacteria with latitude was reported (Fuhrman *et al.*, 2008) and a reversed gradient of diversity for indoor (Amend *et al.*, 2010) and ectomycorrhizal fungal community was suggested (Tedersoo & Nara, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2012). Likewise, it is still unclear whether the community structure changes along the latitudinal gradient. For example, no compositional change was observed for soil fungal community in the Antarctic (Dennis *et al.*, 2012) but a gradual change was reported for ectomycorrhizal fungi across bioclimatic subzones of the North American Arctic (Timling *et al.*, 2012). Amend *et al.* (2010) also reported a structured geographical pattern for indoor fungal community.



**Figure 15.** Localisation of the 31 sites sampled across a European latitudinal gradient. Note that two sites were located very close to each other in North Poland.

**Tableau 2.** Environmental table describing the 31 sites of the latitudinal gradient.

Country	Site name*	% of <i>F. sylvatica</i>	Xwgs	Ywgs	Elevation (m)	pH	Carbon*	Nitrogen*	Phosphorus*	Tman (°C)	Rran (mm)
Sweden	Fano	95	17.37713	59.57144	25	5.5	52.7	3.4	0.44	6.32	482
Sweden	Hallandsasen	100	12.99128	56.41167	120	4.73	160.0	8.0	0.24	7.88	617
Sweden	Norra Grönby	100	13.37637	55.48017	68	5.09	66.0	3.8	0.20	8.02	539
Poland	Gdynia	90	18.47819	54.45621	164	4.08	15.8	0.6	0.29	6.44	550
Poland	Lebork	80	18.50982	54.4302	148	4.16	25.0	1.2	0.17	6.44	550
Poland	Szczecinek	90	16.2072	53.42126	161	4.37	24.3	1.2	0.58	8.37	577
France	Harlettes (62)	80	2.01953	50.72108	196	4.09	37.8	2.2	0.13	9.77	608
France	Buzinval (76)	95	1.55163	49.92294	195	4.18	30.8	1.6	0.07	10.20	595
France	Retonval (76)	60	1.58966	49.80665	187	4.57	21.6	1.3	0.10	9.86	612
France	La Feuillie (76)	80	1.47555	49.45224	164	4.41	29.3	1.6	0.10	10.43	587
France	Le Vaudreuil (27)	90	1.15804	49.2691	128	4.18	29.1	1.4	0.08	10.73	566
France	Rosteig	80	7.35302	48.94507	266	3.91	36.2	1.6	0.06	9.38	582
France	Kerpich aux bois (57)	50	6.94821	48.74728	275	4.7	19.3	1.2	0.13	9.39	575
France	Le rheu (35)	65	-1.79392	48.11243	48	3.98	78.4	4.1	0.15	11.54	557
France	Briaucourt (70)	60	6.25952	47.81452	252	4.67	25.0	1.4	0.11	10.14	597
France	Aroz (70)	80	5.9962	47.62171	228	4.6	18.0	1.0	0.07	10.65	590
France	Sennevieres(37)	80	1.12294	47.13787	84	6.48	70.9	3.5	0.08	11.47	593
France	Fraisans (39)	80	5.7512	47.12501	267	4.59	26.1	1.3	0.07	10.72	592
Italy	Pian Cansiglio (Veneto)	-	12.39347	46.04045	1200	5.09	112.0	6.9	0.30	12.40	565
France	Serenac (81)	65	2.31058	43.98421	345	4.42	46.1	2.3	0.10	12.36	629
France	Aire sur l'Adour (40)	45	-0.23072	43.771	110	4.51	16.9	0.9	0.04	13.79	613
France	Betplan (32)	75	0.22849	43.42683	310	4.73	22.6	1.6	0.13	13.54	607
France	Ponsan Soubiran (32)	70	0.49748	43.34663	340	5.69	22.2	1.6	0.11	12.74	619
France	Lasseube (64)	70	-0.4724	43.24219	202	4.83	19.6	1.2	0.06	11.03	617
Spain	Artikutza Embalse	-	-1.78582	43.22626	534	4.49	63.1	3.7	0.15	11.47	609
France	Josbaig (64)	80	-0.75426	43.22321	266	4.8	23.5	1.5	0.06	11.91	580
France	Cheraute (64)	95	-0.803	43.22058	400	4.95	17.9	1.1	0.08	11.91	580
Spain	Ermita Aitziber (Urdiain-NA)	-	-2.15358	42.92582	580	5.17	37.0	2.6	0.10	11.15	590
Spain	Baztan	-	-1.54433	42.86229	538	4.89	70.6	4.3	0.25	12.03	533
Italy	Serralunga (Abruzzo)	-	13.60973	41.85697	1350	7.12	208.0	10.1	0.18	11.61	572
Italy	Monte Soro (Sicily)	-	14.69569	37.92814	1800	5.65	72.3	4.3	0.25	12.18	453

Tman : mean annual temperature ; Rran : annual precipitations

\* The French Department is indicated into parentheses ; \* The content in elements was expressed in g/kg

An inventory of the many hypotheses underlying the latitudinal pattern has been taken (Willig *et al.*, 2003). The mechanistic understanding requires knowledge about the environmental variables linked to the patterns. Climate is suggested to account for the diversity gradient and temperature was reported as one of the possible explanatory variable for trees and amphibians diversity gradient (Allen *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2003). Likewise, temperature and precipitation were shown to affect a reverse diversity gradient in ectomycorrhizal fungi (Tedersoo *et al.*, 2012).

In this study, we used high-throughput sequencing to access the fungal below-ground responses to environmental variables over a European gradient. The aim of this study was to determine whether the richness of fungal assemblage fits to the latitudinal diversity gradient observed for the majority of organisms *i.e.* declines with latitude. The study has been focused on the ectomycorrhizal fungi and we restricted our investigations on beech forests to alleviate the host effect. Climatic and edaphic variables were selected as potential explaining variables for the fungal species richness and fungal assemblage composition. We hypothesized that (i) fungal and ectomycorrhizal species richness decreases with increasing latitude and decreasing temperature, and (ii) fungal composition alter along the gradient, in relationship with climatic variables.

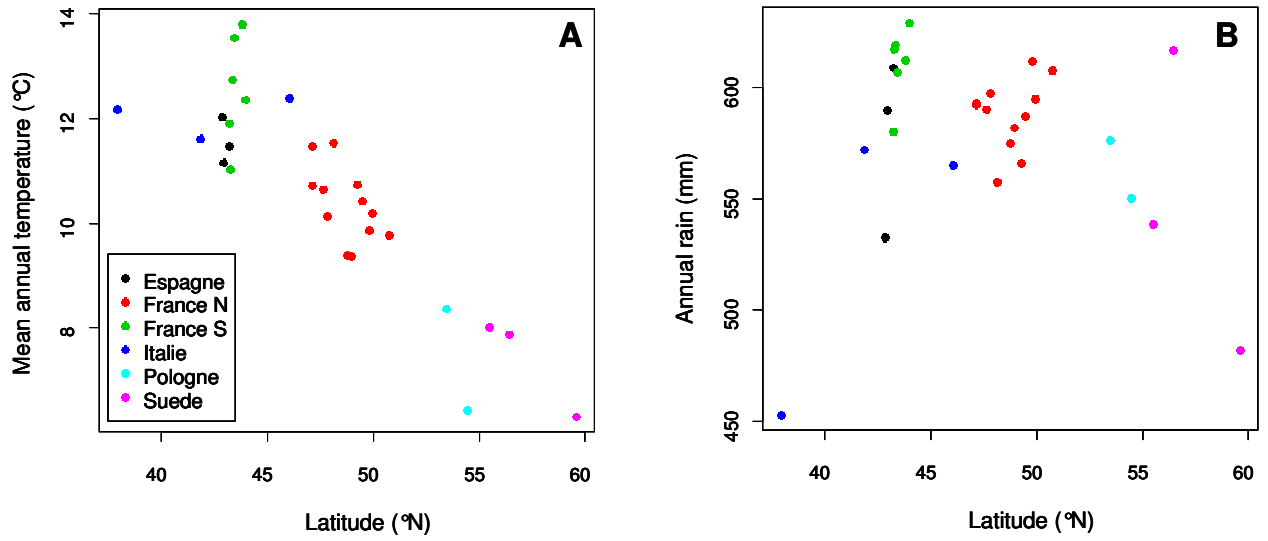
## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental design and sampling**

Thirty-one beech forests along a latitudinal gradient were chosen in Europe (Figure 15). The sites were chosen in lowlands (less than 300m elevation), with the exception of Italian sites that were at elevation of more than 1000m. We selected stands with mature and dominant beech trees (beech basal area > 60% of total basal area, mean diameter at breast height over 30cm) and the range of soil pH was comprise between 4 and 5.5. For each site, three groups of five beech trees were selected. The trees were approximately 5 m apart within a group and the distances between each group were approximately 25 m. Three soil cores (approximately 50 cm<sup>3</sup> with 20 cm depth) at 1 m from the trunk were sampled per tree between September and November 2011. For each given tree, the three soil cores were pooled and dried at ambient temperature before processing. The samples were sieved at 3mm and rocks and roots were discarded. Soil analyses were carried out by the Laboratoire d'Analyse des Sols d'Arras (<http://www5.lille.inra.fr/las>) for pH (water method), total C (NF ISO 10694), total N (NF ISO 13878) and P contents (Duchaufour & Bonneau 1959). Climatic data were obtained from the CRU database, (Climate Research Unit, <http://www.cru.uea.ac.uk/data>). The mean annual temperature and the annual precipitation computed for the period 1970-2000 at the CRU grid point the closest of each site were used. Site informations are displayed in Tableau 2.

### **DNA isolation, PCR amplification, library preparation and 454-pyrosequencing**

The total genomic DNA extraction isolation was carried out using the Fast DNA Spin Kit for Soil (MPBio) (500 mg of homogeneous soil per sample) for the 465 soil samples (31 sites x 3 plots x 5 trees). For each DNA isolation, approximately 15 mg of polyvinylpyrrolidone (PVPP) was added to the samples to neutralize PCR-inhibitors. Manufacturers' instructions were then followed with an additional step: five washings of the binding matrix were successively done with 1 mL of guanidine thiocyanate (5.5 M, pH 7) (Luis *et al.*, 2004). The DNA extracts were diluted to obtain a final metagenomic DNA concentration between 10 and 25 ng/ $\mu$ L. The fungal Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) region was amplified from metagenomic DNA with ITS1F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes and Bruns, 1993) and ITS2 primers (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (White *et al.*, 1990).



For 454 Titanium pyrosequencing of multiplexed amplicons, the forward primer ITS1F was synthesized with a 4-bases multiplexed identifier and a Titanium adaptor A (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-XXXX), whereas the reverse primer ITS2 was adjoined the Titanium adaptor B (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG) before amplification. The amplification of the rDNA ITS1 for samples from the same site was done with the same tag-encoded primer set. The PCR mix preparation was done in 20  $\mu$ L with final concentration of 1X enzyme buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1.12 mg/mL BSA, 0.2 mM dNTP each, 0.4 $\mu$ M tagged primer (ITS1F and ITS2), 0.05 U/ $\mu$ L Taq polymerase (Sigma). The GeneAmp system 9700 was used with 50% ramp for the production of tagged amplicons. The program was as follow: 5 min at 95°C, 35 cycles of 30 sec at 95°C, 40 sec at 53°C and 45 sec at 72°C, and a final step 7 min at 72°C. The PCR reactions were done for each sample separately and amplicons from the same site were then pooled.

The purification of the amplified products was done on a MultiScreen<sub>HTS</sub> PCR Plate MSNU030 (Millipore Corporation) and consisted of two washings with 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O and final resuspension in 40  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. The concentration of each sample was measured three times with the NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer and an equimolar pooling was done. The 454 pyrosequencing was done at the Génoscope (Evry, France).

### **Bioinformatics analysis**

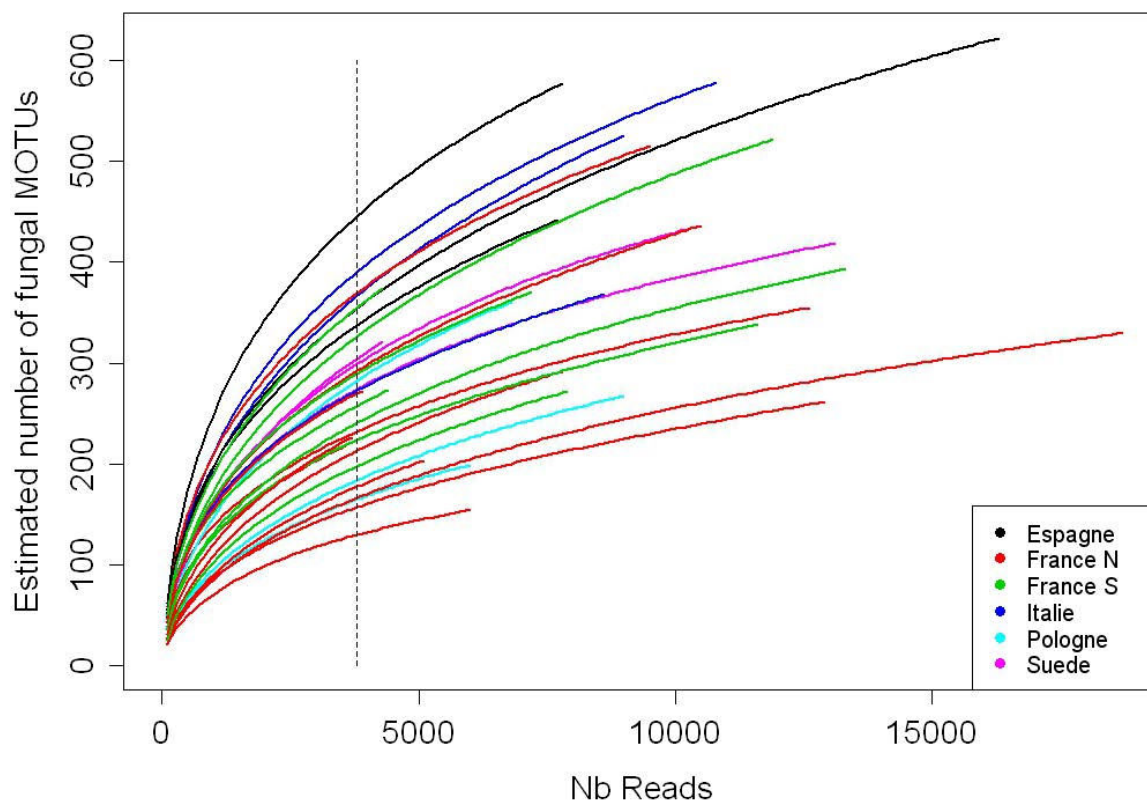
The sequences were sorted into different files according to their multiplex identifier (MID) using sfffile software, with no mismatches allowed for the MIDs, which were then removed. The sequences were cleaned (trimming and denoising) with trim.flows in Mothur version 1.26.0 with the default parameters (Schloss *et al.*, 2009). The ITS1 was extracted using Fungal ITS extractor version 2 (Nilsson *et al.*, 2010). After extraction of the ITS1 region, the sequences were filtered based on a minimal length of 100 bp. Out of a total of 422 026 pyrosequencing reads, 272 395 (64.5%), were retained for downstream analyses. Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) were generated after six successive clusterings with Uclust version 3.0 (Usearch version 6.0.152) (Edgar, 2010) at 97% of similarity. The taxonomic assignation of a consensus sequence, generated by Uclust, was done against a cured GenBank database (July 2012), excluding environmental sequences, with the Basic Local Alignment Search Tool algorithm version 2.2.23 (Altschul *et al.*, 1990), with the filter turned off (i.e. segments of the query sequence that have low compositional complexity were not masked off). This option allowed sequence matching that could not be possible when the filter was on probably because of pyrosequencing overestimation of homopolymers. Ten BLAST hits were considered when available. The phylum name was extracted from the NCBI taxonomy corresponding to the genInfo identifier (GI number).

For the assignation at the genus level, only blast results for which identity > 90 % and e-value  $\leq$  e-50 were considered. The MOTUs were assigned to the genus if at least eight blast hits were congruent with each other for the genus name or all should be congruent when fewer hits were available. The species name was determined only for MOTUs with a genus assignation and at an identity equal or greater to the internal ITS1 similarity among phylum according to Nilsson *et al.*, 2008. The percentage of identity was calculated as the ratio length of identical bases/length of the alignment. Some synonyms were corrected using the online Species Fungorum (<http://www.speciesfungorum.org>). The MOTUs were assigned to the species level if at least six blast hits were congruent with each other for the species name or all should be congruent when fewer hits were available. The MOTUs taxonomically assigned to a same species or matching to a same GI number at > 90 % identity and for a e-value  $\leq$  e-45, were subsequently grouped together reducing further the total number of MOTUs.

**Tableau 3.** Twenty most abundant MOTU.

MOTU	Phylum	Ecological mode	Abundance*	Frequency*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ascomycota	saprobe	27392	27
<i>Motu1</i>	Zygomycota		23812	31
<i>Motu2</i>	Basidiomycota		8142	31
<i>Penicillium sp1</i>	Ascomycota	saprobe	7998	29
<i>Mortierella sp1</i>	Zygomycota	saprobe	7612	31
<i>Mortierella verticillata</i>	Zygomycota	saprobe	5979	31
<i>Oidiodendron sp1</i>	Ascomycota		5624	31
<i>Cryptococcus terricola</i>	Basidiomycota	saprobe	5185	31
<i>Motu3</i>	Ascomycota		4848	13
<i>Russula cyanoxantha</i>	Basidiomycota	ecm	4639	29
<i>Cenococcum geophilum</i>	Ascomycota	ecm	4008	30
<i>Motu4</i>	Unknown		3408	27
<i>Mortierella elongata</i>	Zygomycota	saprobe	3329	27
<i>Umbelopsis sp1</i>	Zygomycota	saprobe	3176	21
<i>Russula rosea</i>	Basidiomycota	ecm	3028	27
<i>Trichoderma asperellum</i>	Ascomycota		2552	31
<i>Penicillium daleae</i>	Ascomycota	saprobe	2378	29
<i>Penicillium sp2</i>	Ascomycota	saprobe	2378	23
<i>Rasamsonia byssochlamydoides</i>	Ascomycota		2211	10
<i>Craterellus cornucopioides</i>	Basidiomycota	ecm	2141	15

\* Abundance was the number of sequences and Frequency the number of sites in which the MOTU was detected.



**Figure 18.** Rarefaction curves for each site of the latitudinal gradient. The fungal richness was estimated for each site at a sequencing effort of 3800 sequences.

## Statistical analyses

A principal component analysis and linear regressions were used for selecting environmental variables that were not colinear.

The few MOTUs that were not of fungal affiliation and those supported by only one sequence (singletons) were discarded. The MOTUs assigned to the genus or the species levels were categorized as EcM fungi (including putative ones) according to previous reports (Rinaldi *et al.*, 2008 ; Smith & Read, 2008 ; Tedersoo *et al.*, 2010).

In order to estimate the richness at a similar sequencing depth, rarefaction curves were computed for each site with the *rarefy* function of the vegan R package (Oksanen *et al.*, 2011). Before rarefaction, one sequence per MOTU was randomly discarded to recreate singletons in the assemblage (Unterseher & Schnittler, 2010). Hence, the number of MOTU per site was estimated at 3 800 sequences per site. The richness of ascomycetes, basidiomycetes and EcM fungi was estimated by multiplying the previously estimated MOTU richness per site by the fraction of MOTU by site that were ascomycetes, basidiomycetes or EcM fungi.

The correspondence analysis (CoA) was used to discriminate the samples based on their assemblage composition. The abundance matrix was rarefied at 3800 sequences per site with the *rrarefy* function of the vegan R package (Oksanen *et al.*, 2011) and then transformed into a presence/absence matrix. The MOTUs present in less than two sites were discarded to prevent distortion of the CoA by the rare MOTUs. The CoA was done with the *dudi.coa* function of the ade4 R package (Dray & Dufour 2007) with default parameters. The values of the two first axes were used as a measure of assemblage composition for subsequent statistical tests.

The linear model was used to test for significant relationships between richness or assemblage composition and selected environmental variables. The significance level was set at 0.05.

## RESULTS

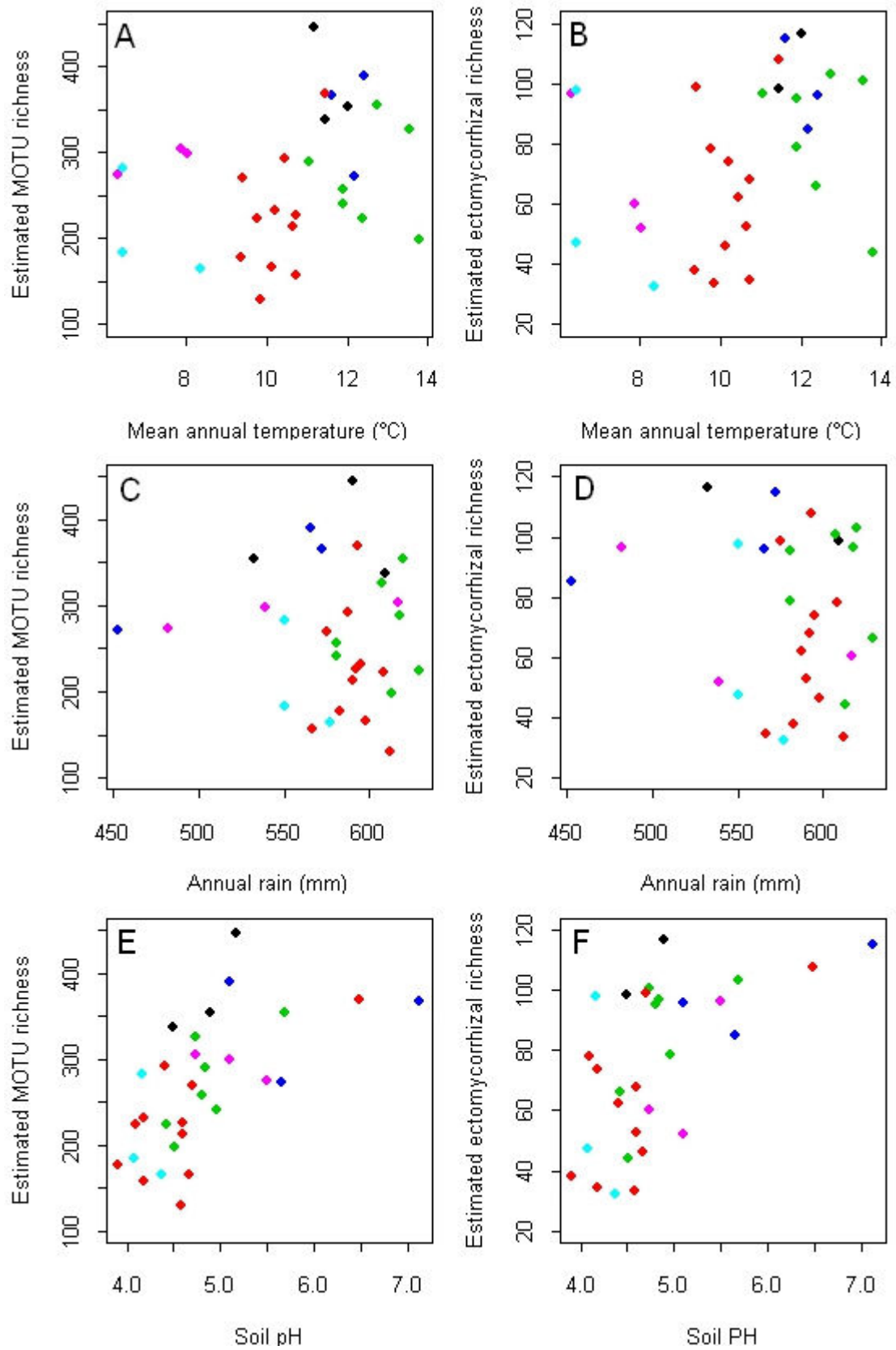
### Selection of environmental variables

The 31 sites distributed in Europe design a latitudinal gradient of 2200 km between Spain and Sweden and 2500 km between Sweden and Italy (Sicily). This geographical gradient is correlated to a temperature gradient between 6 i n 14°C approximately ( $F_{1,29}=105.20$ ,  $pvalue<0.001$  ; Figure 16A), but neither to a gradient of rain ( $F_{1,29}= 0.61$ ,  $pvalue= 0.441$ ; Figure 16B), nor the soil pH ( $F_{1,29}= 0.34$ ,  $pvalue= 0.074$  ; Figure 16B). Thus, the mean values of annual temperature, annual rain and soil pH were used for the statistical analyses with the linear models.

### Analysis of pyrosequencing data

The total number of MOTUs was 5506; of which 2905 (52.8 %) were supported by at least two sequences (non singletons). The most abundant MOTU was *Aspergillus fumigatus* present in 27 sites (Tableau 3). Most of the non-singletons MOTUs (1716, 59.1 %) could not be taxonomically assigned to a genus whereas 641 (22.1 %) could be assigned to the genus level and 548 (18.9 %) to the species level. Most non singletons MOTUs could however be placed within a phylum and 474 (40.0 %) were placed in the Ascomycota, 627 (52.7 %) in the Basidiomycota, 4 ( 0.3 %) in the Chytridiomycota and 84 ( 7.1 %) in the Zygomycota. Additionally, taxonomically assigned MOTUs were divided into three independent ecological groups: 470 (16.2%) mycorrhizal fungi, 321 (11.1%) saprotrophic fungi and 2114 (72.8%) other fungi, including in particular all the species not assigned to the genus. Very few plant pathogens were identified, among which *Armillaria* sp, *Ilonectria radicolola*, *Fusarium solani* and *Leptodontidium elatius*.





**Figure 19.** Relationships between richness and environmental variables. Relationships between fungal (A, C, E) or ectomycorrhizal (B, D, F) estimated richness and mean annual temperature (A, B), annual rain (C, D) and soil pH (E, F).

As the study focussed on identifying mycorrhizal fungi, less efforts were put into saprobe identification and may result in an underestimation of the saprotrophic and pathogenic fungi number. Eighty percent of the MOTUs were detected in less than five out of the 31 sites (Figure 17). However, species from the genera *Aspergillus*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Cryptococcus* or *Trichoderma* were relatively frequent as they were detected in more than 20 sites. Among frequent mycorrhizal fungi detected in more than 20 sites were *Amanita rubescens*, *Cenococcum geophilum*, *Elaphomyces* sp., *Genea hispidula*, *Laccaria amethystina*, *Oidiodendron pilicola*, *Tomentella terrestris* and several *Russula* spp., like *R. cyanoxantha*, *R. fellea*, *R. nigricans* and *R. rosea*.

### **Latitudinal gradient of species richness**

The fungal richness decreases along the latitudinal gradient. The total fungal richness was not significantly correlated with latitude ( $F=3.27$ ,  $pvalue=0.081$ ) but the ectomycorrhizal richness was ( $F= 5.98$ ,  $pvalue=0.021$ ).

### **Environmental variables related to the estimated richness of total fungi and to ectomycorrhizal fungi**

The estimated richness ranged from 150 to 450 fungal MOTUs per site (Figure 18). Among the taxonomically identified MOTUs, there were 22 to 121 mycorrhizal MOTUs per site.

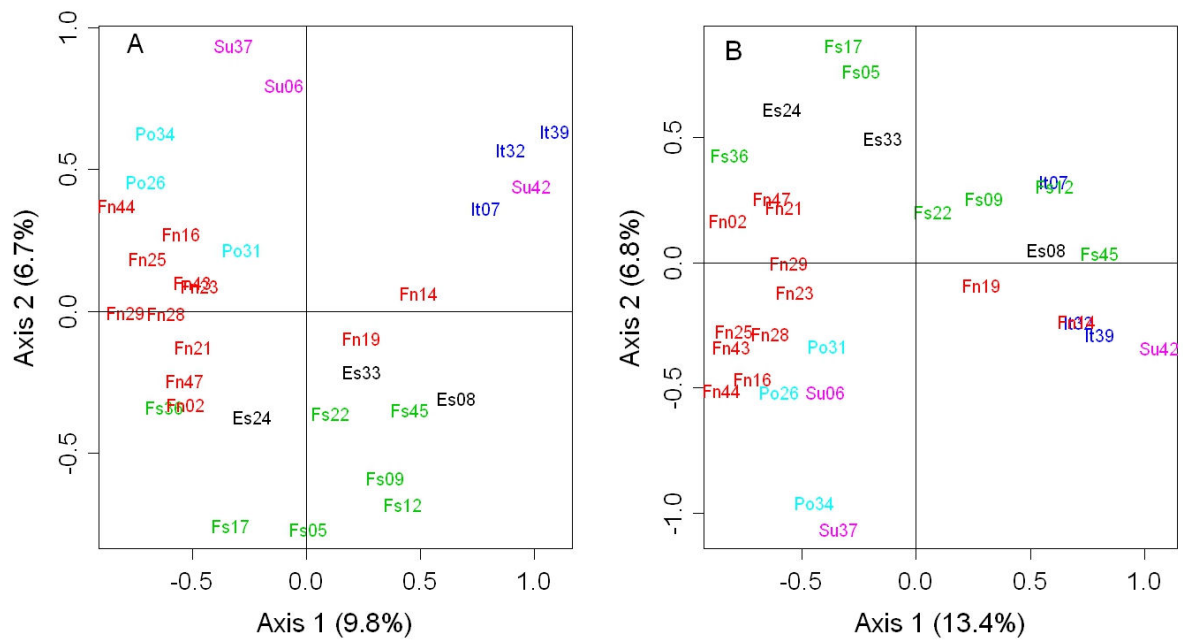
The richness increased with soil pH whatever the assemblage considered. The total fungal richness was significantly correlated with the soil pH ( $F=15.33$ ,  $pvalue<0.001$ ) but neither to the annual precipitations ( $F=0.023$ ,  $pvalue=0.634$ ), nor the mean annual temperature ( $F=0.44$ ,  $pvalue=0.513$ ) (Figure 19). Also, the richness of ectomycorrhizal fungi increased significantly with the soil pH ( $F= 11.17$ ,  $pvalue=0.003$ ). As for the total fungal richness, the mycorrhizal richness was not significantly correlated to neither the annual precipitations ( $F=0.01$ ,  $pvalue=0.911$ ), nor the mean annual temperature ( $F=0.75$ ,  $pvalue=0.393$ ) (Figure 19). Similarly, the richnesses of ascomycetes and basidiomycetes assemblages studied separately were significantly correlated to the soil pH but to none of the climatic variables (results not shown).

### **Environmental variables related to fungal and mycorrhizal assemblages composition**

Correspondence analysis was used to investigate assemblage composition along the gradient. For the fungal assemblages, the two first axes of the CoA explained 9.8 and 6.7 % of the variability respectively (Figure 20A) and 13.4 and 6.8 % for the mycorrhizal assemblages (Figure 20B). The sites located in the same geographic region were close to each other on both CoA (Figure 20), suggesting fungal assemblage divergence with the geographical distance.

Furthermore, the sites are distributed on the second axis according to the latitudinal gradient, with northern Europe sites having higher coordinates on axis 2 and southern Europe sites having lower coordinates on axis 2. However, Italian sites were at the same level as Swedish and Polish sites on the axis 2 of the CoA with fungal assemblage (Figure 20A).

The first axis of the CoA with the fungal assemblage was significantly correlated with soil pH ( $F=57.97$ ,  $pvalue<0.001$ ; Figure 21E) and with the annual rain ( $F=6.68$ ,  $pvalue=0.015$ ) but not with the mean annual temperature ( $F=2.29$ ,  $pvalue=0.142$ ; Figure 21 A). The second axis was significantly correlated to the mean annual temperature ( $F=14.56$ ,  $pvalue<0.001$ ; Figure 21B) and to the annual rain ( $F=11.19$ ,  $pvalue = 0.002$ ; Figure 21D), but not to the soil pH ( $F=0.33$ ,  $pvalue=0.573$ ; Figure 21F). However, the correlation with the annual rain could be due to the two dryer sites from Italy and Sweden (Figure 21C and 7D).



**Figure 20.** Correspondence analysis of the samples according to the assemblage. Fungal assemblage (A) and mycorrhizal assemblage (B). Es, Spain; Fn, North of France; Fs, South of France; It, Italy; Po, Poland; Su, Sweden. The variability explained by the axes is indicated into parentheses.

Similar results were found considering the mycorrhizal assemblage. The CoA showed a separation of the Mediterranean EcM communities from the boreal and continental (Poland) (Figure 20B). Additionally, the first axis of the CoA was correlated to the soil pH ( $F=42.38$ ,  $pvalue<0.001$ ; 0A) and the second axis was correlated to the mean annual temperature ( $F=22.23$ ,  $pvalue<0.001$ ; 0B) (Figure 22).

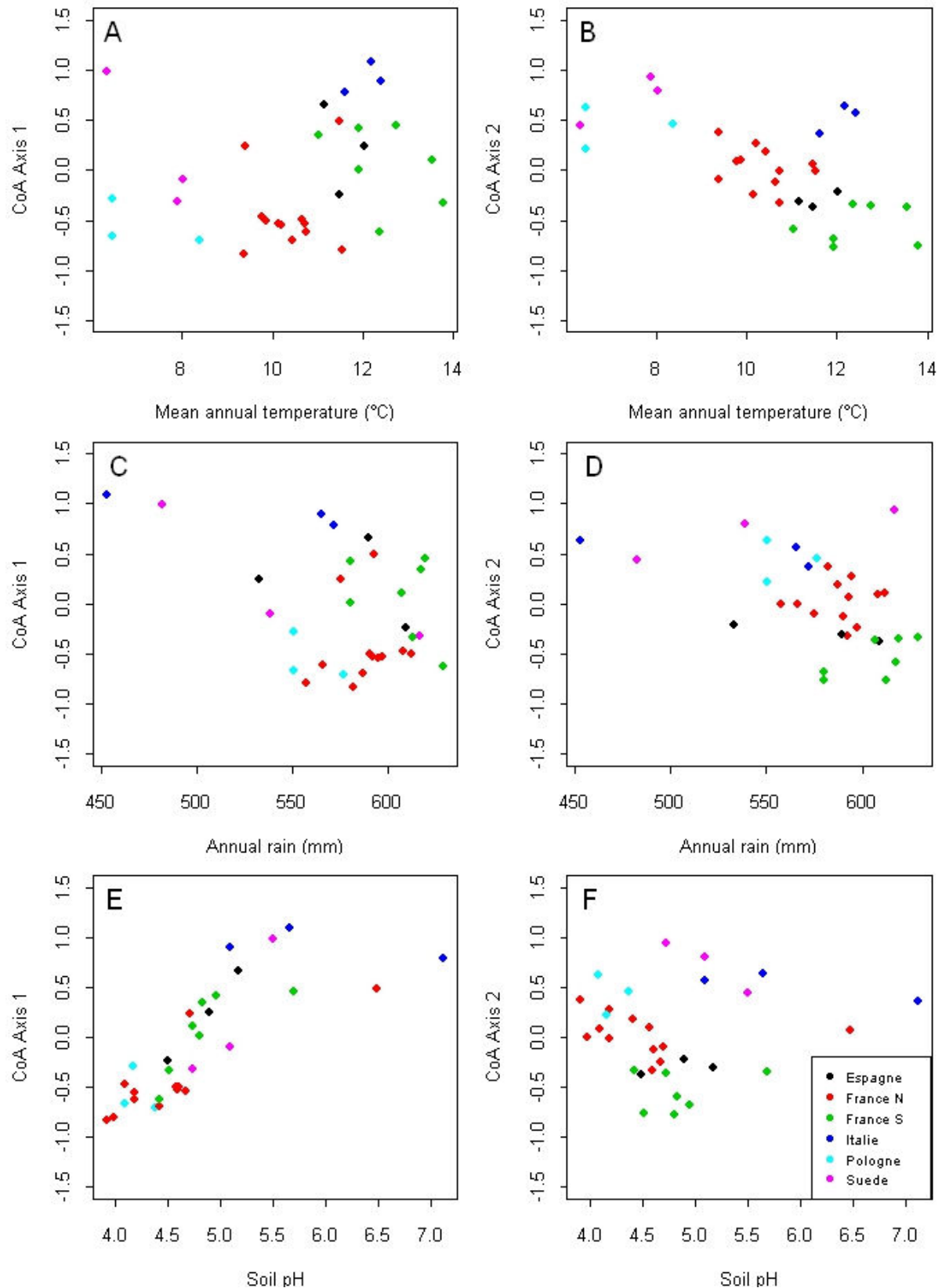
## DISCUSSION

The animal and plant latitudinal diversity gradients have been studied for a long time (Gaston 2000), but these patterns have not yet been clearly ascertain for unicellular organisms (Fuhrman *et al.*, 2008 ; Ladau *et al.*, 2013) and for fungi (Amend *et al.*, 2010 ; Bjorbaekmo *et al.*, 2010 ; Tedersoo & Nara, 2010 ; Tedersoo *et al.*, 2012 ; Timling *et al.*, 2012). Our results showed that the fungal assemblages exhibit geographic patterns of species diversity that are similar to those seen in other organisms. Indeed, the decrease in richness along the latitudinal gradient is consistent with what is generally observed for animals and plants (Hawkins *et al.*, 2003; Willig *et al.*, 2003) but contrasts with the suggested increase of ectomycorrhizal richness with latitude (Tedersoo *et al.*, 2012, Tedersoo & Nara, 2010). Other groups were found as exceptions to the general latitudinal richness gradient, e.g. ichneumon wasps or breeding birds in Northern America (Willig *et al.*, 2003) or marine bacteria in winter time (Lauber *et al.*, 2013).

Indeed, Tedersoo & Nara (2010) suggested that the soil habitat and the host lineage diversities could be the most contributors of the mycorrhizal richness pattern at large scale. Actually, it is recognized that such associations derive from hidden covariances among latitude and unmeasured spatially patterned environmental variables, most of which are components of climate (Bradford *et al.*, 2004). For these reasons, the present study considered temperate beech dominated forest only with environmental variables, other than climatic, that were relatively stable along this European gradient. Additionally, Willig *et al.* (2003) reported that many of the exceptions to the classical pattern were due to a scale effect. In their review on macroorganisms, they defined short latitudinal gradient as those ranging less than 20° in extent. This study on microorganisms encompassed sites from 37°N to 59°N, which is slightly more than the threshold given by Willig *et al.* (2003) and may thus not suffer from the scale effect. Thus, the chosen latitudinal gradient was a suitable proxy for studying the relationship between microbial assemblages and the energy availability.

In our study, the richness of the fungal or ectomycorrhizal assemblage did not significantly correlate with climatic variables. However, Bahram *et al.* (2012) found a decrease of mycorrhizal diversity with decreasing temperature, which is in accordance with the response of the major groups to the temperature (Hawkins *et al.* 2003). The temperature could drive mycorrhizal assemblage directly through the climatic niche (thermal optimum, winter survival) or indirectly through the host community or the soil nutrient availability. Environmental variables other than temperature are also found correlating with diversity, e.g. precipitations (Bahram *et al.*, 2012, Hawkins *et al.*, 2003) although this was not confirmed in our study. Discrepancies in conclusions between studies may be due to flaws in estimating richness, which might be subjected to substantial bias described in Haegeman *et al.*, 2013.

The second most important result concerned the impact of environmental variables on fungal assemblage structure at this continental scale. Indeed, the composition of the fungal and mycorrhizal assemblages correlated significantly with the soil pH and the mean annual temperature. It is still unclear whether soil fungal composition changes with latitude.



**Figure 21.** Relationships between fungal assemblage and environmental variables. The relationships are between the position of the samples on the correspondence analysis axis 1 (A, C, E) and 2 (B, D, F) for fungal assemblage and mean annual temperature (A, B), annual rain (C, D) and soil pH (E, F).

Recently, Dennis *et al.* (2012) reported no change in soil fungal community along a latitudinal gradient in Antarctic. Unfortunately, they could not access to climatic data but still found that communities changes with soil variables such as carbon:nitrogen ratio and soil pH. In this study, soil pH, annual precipitation and mean annual temperature were the main variables linked with the global fungal assemblage composition as they correlated with the site position of the CoA.

The soil pH, which is known as a major variable controlling plant community (Gough *et al.* 2001 ; Wamelink *et al.* 2005), has been also shown to strongly impact the structure of soil microbial community (Fierer and Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2011). Moreover, the mean annual temperature and the position of the sites on the second axis were significantly correlated, revealing a significant climatic effect on the fungal community structure. It should be noted that the Italian sites were similar to cooler sites like Sweden sites on the CoA. One possible explanation is a biased estimation of the mean annual temperature. Indeed, the CRU database overestimated the mean annual temperature from the Italian sites, which were located in mountains compared to the other sites from the gradient, which were from the plain.

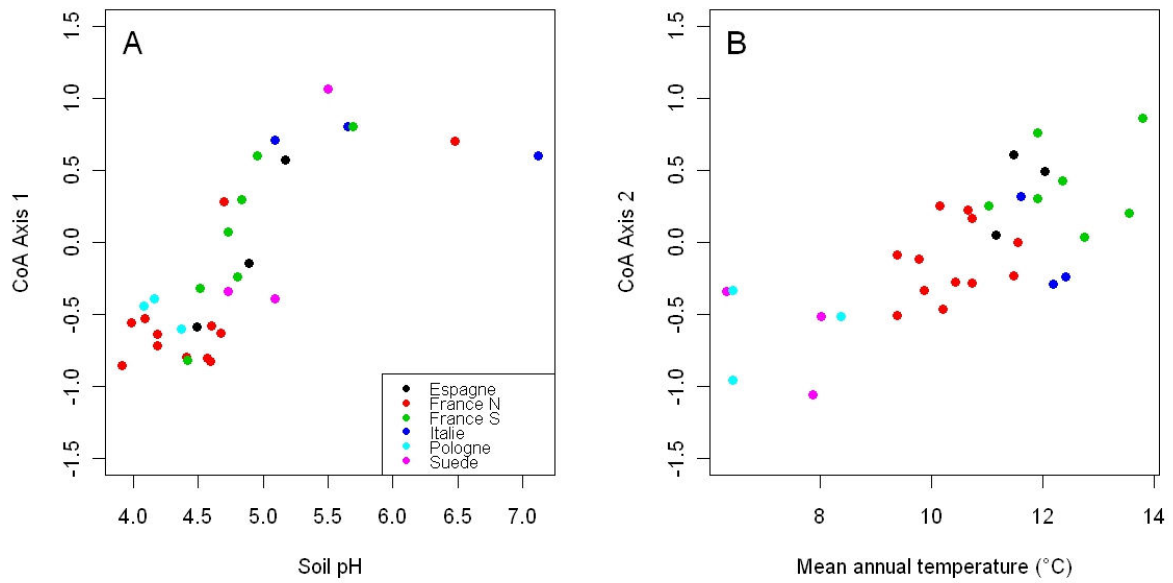
It is one of the first times that forest soil fungal communities are monitored at European scale. High throughput sequencing clearly highlighted the huge diversity of fungi in forest soil. Indeed, we found 2924 MOTUs supported by at least two sequences (5527 MOTUs including the singletons). Among these 5527 MOTUs, only 86 of them (1.55%) were classed in the Zygomycota division. But, interestingly, two of the three most abundant MOTUs are Zygomycota: *Umbelopsis dimorpha* and *Mortierella* sp1. In the top ten of soil fungal species, three ectomycorrhizal (EcM) fungi have been identified: *Russula cyanoxantha*, *Oidiodendron* sp1 and *Cenococcum geophilum*. *R. cyanoxantha* is very common in Europe and *C. geophilum* has been reported as an ubiquitous EcM species in several studies (Pigott 1982; Buée *et al.*, 2005; Dickie, 2007; Matsuda *et al.*, 2009). *Oidiodendron* is also a cosmopolitan genus whose members can usually be found in soil or colonizing different organic substrates, as leaf litter. Additionally, some *Oidiodendron* species have also been reported as ericoid mycorrhizal fungi (Couture *et al.* 1983, Dalpé 1989, Hambleton & Currah 1997, Lacourt *et al.* 2001). In this study, the ecological status of *Oidiodendron* sp1 is unclear because of the limited presence of Ericaceae in the different forest sites investigated.

## CONCLUSION

The chosen latitudinal gradient was a suitable proxy for studying the relationship between microbial assemblages and the mean annual temperature. Fungal richness was significantly related to soil pH while the composition was related to both soil pH and the climatic variables. These conclusions also apply for the ectomycorrhizal assemblage. Additional studies are required to confirm these results in temperate regions.

## ACKNOWLEDGEMENTS

AC's scholarship was funded by grants from Biodiversity and Climate Change: A Risk Analysis (BACCARA) European Research Project and from the Region Lorraine. Olivier Caël, Xavier Capdevielle and Lydia Bousset are acknowledged for sampling in France. Cindy Dubois, Livin Fresnel Bikindou and Ismahane Kamoune are acknowledged for technical assistance in the laboratory. Frédérick Gavory and Corinne Cruaud from the Génomoscope (Evry) are acknowledged for the 454 sequencing of the samples (project n°42 AP09/10). The authors also thank F. Martin for access to the UMR1136 IAM computing resources and Juliette Lengellé for the bioinformatic support.



## REFERENCES

- Allen AP, Brown JH, Gillooly JF, 2002. Global biodiversity, biochemical kinetics, and the energetic-equivalence rule. *Science* 297:1545–1548.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD, 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555-5565.
- Baas Becking, L.G.M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).
- Bahram M, Pöhlme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo L. (2012). Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol.* 193:465–73.
- Bjorbækmo MF, Carlsen T, Brysting A, Vrålstad T, Høiland K, Ugland KI, Geml J, Schumacher T, Kauserud H, 2010. High diversity of root associated fungi in both alpine and arctic *Dryas octopetala*. *BMC Plant Biol.* 10:244.
- Chave J. 2013 The problem of pattern and scale in ecology: what have we learned in 20 years? *Ecol. Lett.* 1:4-16.
- Dennis PG, Rushton SP, Newsham KK, Lauducina VA, Ord VJ, Daniell TJ, O'donnell AG, HopkinsDW (2012) Soil fungal community composition does not alter along a latitudinal gradient through the maritime and sub-Antarctic. *Fungal Ecology* 5: 403-408
- Dray S, Dufour AB. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22:1–20.
- Duchaufour P, Bonneau M, 1959. Une nouvelle méthode de dosage du phosphore assimilable dans les sols forestiers. *Bulletin de l'AFES* 41:193-198.
- Edgar RC. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460–2461.
- Fenchel T & Finlay BJ, 2004. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience*
- Fierer N, Jackson RB, 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103:626–631.
- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC, 2009). Global patterns in belowground communities. *Ecol Lett* 12:1238–49.
- Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR, Knight R. (2011). Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92:797–804.
- Fuhrman JA, Steele JA, Hewson I, Schwalbach MS, Brown MV, Green JL, Brown JH. 2008 A latitudinal diversity gradient in planktonic marine bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3;105(22):7774-8
- Gardes M, Bruns TD. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ, 2004. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432: 747-750.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M, Whiteley AS. 2011 The bacterial biogeography of British soils. *Environ Microbiol.* 13(6):1642-54.



- Haegeman B, Hamelin J, Moriarty J, Neal P, Dushoff J, Weitz JS. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J.* 2013 Feb 14. doi: 10.1038/ismej.2013.10.
- Hättenschwiler S, Tiunov AV, Scheu S (2005) Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *An Rev of Ecol Evol and System* 36:191–218.
- Hawkins BA, Field R, Cornell HV, Currie DJ, Gue'gan JF, Kaufman DM, Kerr JT, Mittelbach GG, Oberdorff T, O'Brien EM. 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* 84: 3105–3117.
- Hawksworth DL, 2001. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk PM, Nilsson RH, 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25: 38-47.
- Hillebrand H. (2004) On the generality of the latitudinal diversity gradient. *American Naturalist* 163, 192–211.
- Ladau J, Sharpston TJ, Finucane MM, Jospin G, Kembel SW, O'Dwyer J, Koeppl AF, Green JL, Pollard KS. Global marine bacterial diversity peaks at high latitudes in winter. *ISME J.* 2013 doi: 10.1038/ismej.2013.37.
- Luis P, Walther G, Kellner H, Martin F, Buscot F, 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol. & Biochem.* 36:1025-1036.
- Nilsson RH, Veldre V, Hartmann M, Unterseher M, Amend A, Bergsten J, Kristiansson E, Ryberg M, Jumpponen A, Abarenkov K, 2010. An open source software package for automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology* 3: 284-287.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H, 2011. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.0-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Rinaldi AC, Comadini O, Kuyper TW. (2008). Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1–45.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, *et al.* (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4:1340–1351.
- Schloss P D, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, *et al.* (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology* 75:7537–7541.
- Smith SE, Read D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press: London.
- Tedersoo L, Nara K. (2010). General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 185:351–354.
- Tedersoo L, May TW, Smith ME. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217–263.
- Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, Põlme S, Ryberg M, Smith ME, Kõljalg U. (2012) Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21:4160-70.
- Tedersoo L, Mett M, Ishida TA, Bahram M, 2013. Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.12328.

- Timling I, Dahlberg A, Walker DA, Gardes M, Charcosset JY, Welker JM, Taylor DL, 2012. Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere* 3:111.
- Unterseher, M & Schnittler M (2010) Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology* 3:366-378.
- Wamelink, G.W. W., Goedhart, P. W., Van Dobben, H. F. and Berendse, F. (2005), Plant species as predictors of soil pH: Replacing expert judgement with measurements. *Journal of Vegetation Science*, 16: 461–470.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 315–322.
- Wiens JJ, Ackerly DD, Allen AP, Anacker BL, Buckley LB, Cornell HV, Damschen EI, Jonathan Davies T, Grytnes JA, Harrison SP, Hawkins BA, Holt RD, McCain CM, Stephens PR. 2010 Niche conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecol. Lett.* 13:1310-24.
- Willig MR, Kaufman DM, Stevens RD, 2003. Latitudinal gradients of biodiversity : pattern, process, scale, and synthesis. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34:273–309.

# DISCUSSION

## 1. Stratégie d'échantillonnage

Les premiers articles consacrés à l'étude des communautés fongiques par les outils de séquençage haut débit ont généré un véritable engouement pour ces technologies appliquées à l'écologie des champignons (Hibbett *et al.*, 2009), mais aussi soulevé de nombreux commentaires et réflexions, allant de l'échantillonnage à l'exploitation des données (Lindahl *et al.*, 2013). Aussi, dans la perspective d'étude le long de gradients géographiques, où la parcelle serait l'unité de base, la question se posait de savoir comment échantillonner au mieux sur une parcelle afin de décrire au plus juste la communauté fongique présente.

Plusieurs questions se posent sur l'échantillonnage et en particulier sur le type et la taille des échantillons, le nombre d'arbres à échantillonner et la profondeur de séquençage. A titre d'exemple, Buée *et al.* (2009) avaient échantillonné huit carottes de sol de 1 x 1 cm sur 5 cm de profondeur pour estimer la diversité d'une parcelle de hêtraie (30m x 30m). Mais, les produits d'amplification ayant été regroupés, l'hétérogénéité spatiale et la représentativité de la diversité du site n'avaient pas pu être discutées. Notre travail apporte à ces questions des éléments de réponses, et en particulier par l'étude préliminaire.

### 1.1. Type d'échantillon

Lors de cette première étude, un ensemble de 20 hêtres contigus a été considéré et les communautés fongiques du système racinaire ont été comparées aux communautés du sol environnant les racines. Cette étude a établi que le sol pouvait être un substitut intéressant du système racinaire pour étudier les EcM car il permet une description assez précise de la communauté EcM tout en facilitant fortement la gestion des échantillons. Les gains en termes de temps et de gestion des échantillons sont déterminants car ils permettent de multiplier les parcelles étudiées. Pour la deuxième étude sur gradients d'altitude, les communautés EcM ont pourtant été étudiées à partir d'échantillons de racines car les résultats de l'étude préliminaire n'étaient pas encore disponibles pour la campagne d'échantillonnage. Par contre, pour la troisième étude, le sol a donc été sélectionné à la place des racines.

Le fait que 76% des EcM inventoriés à Lignéville soient détectés à la fois à partir des racines et du sol ne permet pas de préjuger de la taille du réservoir de spores de champignons EcM dans le sol forestier. De même, cette seule observation ne permet pas de déterminer si les racines n'exercent aucun filtre sur la communauté présente dans le sol et avec laquelle elles s'associent ou bien si les espèces fongiques EcM associées aux racines ont un avantage pour se disperser dans le sol ce qui empêcherait la détection des autres espèces EcM présentes dans le sol mais sous forme non symbiotique.

## **1.2. Profondeur de sol**

Pour la troisième étude, nous avons prélevé les échantillons de sol sur une profondeur plus importante que pour la deuxième étude (20 au lieu de 10 cm). En effet, cette étude inclut une large diversité de type de sols (avec des humus allant de l'oligomull au moder) dont le profil vertical est différent, justifiant cette profondeur d'échantillonnage assez conséquente pour intégrer au mieux les communautés EcM. En effet, il existe une hétérogénéité dans la distribution verticale et horizontale des racines selon les essences (Pregitzer *et al.*, 2002), qui dépend des paramètres physico-chimiques des sols (Schmid, 2002 ; Smilauerová & Smilauer, 2002). Ceci est en particulier vrai pour le hêtre, Bakker *et al.* (2008).

De plus, les racines fines superficielles des arbres restent majoritairement localisées dans les zones enrichies en matière organique et les champignons mycorhiziens y ont été décrits comme plus abondants, même si certaines espèces semblent spécifiques aux compartiments inférieurs (Taylor, 2002 ; Lindahl *et al.*, 2007). Ainsi, dans notre étude préliminaire, la masse racinaire était plus abondante dans les 10 premiers centimètres de profondeur que dans l'horizon 10-20 cm. Ainsi, les champignons non-mycorhiziens auraient moins de contraintes au regard de cette hétérogénéité racinaire et serait donc distribués de manière plus homogène au sein d'un site mais ceci n'est pas vérifié à Lignéville (données non présentées).

**Tableau 4.** Variabilité intrasite de la richesse fongique.

	<b>Pilote</b>	<b>Altitude</b>	
	Lignéville	Lignéville	11 sites français
<b>Unité d'échantillonnage</b>	arbre	grappe de 5 arbres	grappe de 5 arbres
<b>Nombre d'unité d'échantillonnage par parcelle</b>	20	3	3
<b>Effort de séquençage/unité</b>	900	500	500
<b>Richesse estimée des champignons (MOTU)/unité</b>	74 - 131	115 - 120	89 - 156
<b>Ecart entre richesse min et max au sein d'une parcelle</b>	57	5	3 - 32

### 1.3. Nombre d'arbres échantillonnés (étendue)

L'étude préliminaire montre qu'un échantillonnage autour de 15 arbres représente un bon compromis pour décrire la communauté fongique du sol associée au hêtre. En effet, un nombre d'arbres élevé est souhaitable, mais induit une augmentation de l'étendue ce qui risque d'augmenter l'hétérogénéité au sein de l'environnement considéré. Par exemple, dans la parcelle étudiée à Lignéville, la communauté fongique du sol était structurée spatialement selon un gradient de ratio carbone / azote et de phosphore. Le compromis de 15 arbres s'est révélé acceptable dans la suite des travaux.

En effet, pour l'étude sur le gradient altitudinal, nous avons pu mesurer la variabilité intra-parcelle car les analyses de communauté étaient réalisées par grappes de 5 arbres (3 grappes par parcelle). Les résultats montrent que si la variabilité intra-parcelle reste conséquente du point de vue de la richesse des communautés (variance résiduelle intra-parcelle de l'ordre de 30-45%), elle est beaucoup moins importante du point de vue de la composition des communautés (variance résiduelle de l'ordre 2-25% pour les axes 1 et 2 de l'AFC). Toutefois, les 3 grappes n'étaient pas contiguës au sein de la parcelle, ce qui peut augmenter l'hétérogénéité environnementale et donc la variabilité intra-parcelle. Une plus grande proximité spatiale des grappes pourrait donc diminuer l'influence de cette variabilité tout comme a pu le faire le fait de grouper 5 arbres par échantillon. En effet, si on compare les résultats de la première et de la seconde expérience à Lignéville pour une même profondeur de séquençage, il y avait un écart de richesse de 57 MOTU fongique entre les échantillons extrêmes pour l'expérience pilote (n=20 arbres) alors qu'il n'était que de 5 MOTU entre les trois grappes lors de la deuxième étude (Tableau 2). Ainsi, cette stratégie de trois grappes de cinq arbres par parcelle a donc bien diminué la variabilité intra-parcelle.

Dans le cas des gradients d'altitude, le modèle mixte utilisé suggère que la variance intra-parcelle s'élève à respectivement 8,0% et 29,1% pour les deux premiers axes de l'AFC pour les champignons racinaires. Ces proportions sont de 13,5 et 24,0% lorsque seuls les champignons mycorhiziens sont pris en compte dans l'AFC.

De manière très nette, la variabilité intra-parcelle liée à la composition en champignons associés aux racines est plus forte que pour les champignons de la phyllosphère. Une première hypothèse serait que l'hétérogénéité entre arbres au niveau du sol est supérieure à celle du milieu aérien. Une seconde hypothèse serait qu'une partie des champignons telluriques aurait une dispersion plus limitée en distance comparé aux champignons aériens. Même si nos

inventaires ont montré que beaucoup des champignons du sol ont des fructifications épigées (en particulier les nombreux EcM), ce n'est pas le cas de tous les champignons. De plus, la connaissance des capacités de dispersion des MOTU inconnus est *de facto* inexistante, mais il est possible qu'ils soient justement restés inconnus jusqu'à présent parce qu'ils n'ont pas de formes épigées. C'est en partie pour cela que les études de communautés fongiques ne reposent plus sur les inventaires des fructifications.

#### **1.4. Profondeur de séquençage**

L'estimation de la richesse est aussi très dépendante de la profondeur de séquençage. Cela traduit l'effet déterminant de l'effort d'échantillonnage qui est classique en écologie (Taylor, 2002). Nos analyses confirment cet effet car dans les trois études réalisées, la relation entre profondeur de séquençage par échantillon et richesse spécifique est très significative. La parcelle de Lignéville, étudiée à la fois durant l'étude préliminaire et durant l'étude du gradient altitudinal, permet de tester la reproductibilité de notre estimation de richesse fongique même si les arbres sélectionnés n'étaient pas les mêmes. Lors de l'étude préliminaire, la richesse fongique estimée à Lignéville est presque deux fois supérieure à celle estimée sur cette même parcelle lors de l'étude du gradient altitudinal (737 versus 420 MOTU). Nos résultats montrent que cela s'explique principalement par une profondeur de séquençage 4 fois supérieure, ajoutée à un plus grand nombre d'arbres échantillonnés. Par contre, en échantillonnant aléatoirement les données de l'étude préliminaire afin d'avoir un effort d'échantillonnage équivalent à celui de la deuxième étude (15 arbres, 9800 séquences), la richesse estimée est de l'ordre de  $450 \pm 10$  MOTU alors qu'elle est de 420 MOTU dans l'étude du gradient altitudinal. Il y a donc une concordance relativement bonne et une bonne reproductibilité à effort d'échantillonnage et de séquençage équivalent.

Dans le contexte de la thèse, l'effort de séquençage par parcelle a été réduit avec l'augmentation du nombre de parcelles par étude. Il faut remarquer que l'hétérogénéité de l'effort de séquençage entre échantillon d'une même étude pose de gros problèmes (de 500 à 3500) dans l'étude du gradient altitudinal. En effet, la raréfaction doit se faire au niveau du plus faible effort de séquençage, ce qui entraîne une forte perte d'efficacité. Une préparation plus robuste des mélanges équimolaires avant séquençage aurait probablement permis de minimiser la différence de profondeur de séquençage entre les échantillons multiplexés. Cette optimisation aurait notamment pu se faire lors de l'estimation des concentrations en amplicons. La technique utilisée lors de la thèse pour doser les acides nucléiques est basée sur

la mesure de l'absorbance et ne semble pas assez performante ; une autre technique basée sur une mesure de fluorescence semble plus précise et serait à tester dans le futur.

Par ailleurs, les différences d'effort de séquençage peuvent engendrer des difficultés lors de la comparaison des données publiées, dans la perspective de méta-analyses en écologie microbienne.

Dans nos études, la profondeur de séquençage, bien qu'elle affecte l'estimation de la richesse, elle n'affecte pas le classement des unités d'échantillonnage entre elles car les courbes de raréfaction ne se croisaient pas. Pourtant, ce classement pourrait être remis en cause Haegeman *et al.* (2013) argumentent que ce classement peut être biaisé du fait que la méthode d'échantillonnage des données ne tiendrait pas compte du nombre d'espèces rares dans chaque échantillon.

### **1.5. Nombre de parcelles (variabilité inter-parcelle et inter-gradient)**

Afin d'étudier les communautés fongiques en relation avec le climat, deux types de gradients ont été utilisés correspondant à deux stratégies d'expérience. La deuxième étude comprend plusieurs gradients d'altitude ayant chacun entre 3 et 5 parcelles et constituant chacun une répétition alors que la troisième étude comprend un seul gradient latitudinal constitué de 31 parcelles. Le nombre de parcelles à étudier dépend naturellement de la question posée mais aussi des contraintes déjà évoquées, notamment la lourdeur du travail, dont une amélioration est possible par l'extraction d'ADN directement à partir du sol.

Dans l'étude sur les gradients altitudinaux, la variabilité de richesse fongique tellurique entre sites est bien que plus importante que la variabilité intra-parcelle et inter-gradient. La richesse des communautés de champignons du sol et celle des ectomycorhiziens sont similaires dans nos 3 gradients (Vosges, Alpes et Pyrénées). De façon intéressante, la richesse fongique de la phyllosphère est quant à elle principalement liée aux gradients dans cette étude. Les différentes communautés ne réagissent pas de façon similaire.

Les résultats montrent que les communautés fongiques racinaires et ectomycorhiziennes des trois gradients français étaient relativement distinctes. Cela corrobore les résultats de Wubet *et al.* (2012) qui montrent une différence significative dans la structure des communautés fongiques entre trois régions d'Allemagne. Egalement, une étude sur plusieurs espèces d'aulnes montre que la variabilité des communautés EcM est expliquée par des composantes liées à l'espace (Polme *et al.*, 2013). Cette structuration régionale a également été observée pour ces champignons de la phyllosphère car les sites des Pyrénées contiennent des



communautés bien distinctes de celles des Alpes et des Vosges. Comme observé chez les plantes, il existe donc un régionalisme chez les communautés fongiques.

## **2. Richesse et composition des communautés fongiques**

### **2.1. Relation au climat**

#### **2.1.1. Richesse**

Nos résultats n'apportent pas d'éléments clairs supportant l'hypothèse que la richesse spécifique des communautés de champignons dépend de manière significative des variables climatiques. En effet, aucun lien n'a été observé entre la richesse globale des communautés fongiques (champignons associées aux racines fines de hêtres) et les variables climatiques le long des trois gradients d'altitude étudiés et le long d'un gradient latitudinal européen. Toutefois, les champignons englobent des groupes taxonomiques et écologiques très différents qui pourraient répondre différemment aux variables environnementales. C'est pourquoi différents groupes, tels que les Ascomycota, les Basidiomycota, les champignons mycorhiziens ont été étudié séparément. Dans l'étude le long de gradients d'altitude, la richesse spécifique des ascomycètes des racines fines augmentait avec la température alors que celle des autres groupes n'en dépendait pas. Cette observation est en accord avec les résultats d'autres études ciblant les champignons ectomycorhiziens (Deslippe *et al.*, 2011 ; Bahram *et al.*, 2012) qui eux aussi observent un accroissement de la richesse des champignons mycorhiziens avec la température moyenne annuelle des sites. Dans l'étude sur le gradient latitudinal, les conclusions pour les différents groupes étaient similaires.

Toutefois, la réponse observée le long des deux types de gradient (altitudinaux ou latitudinaux) est différente. Cette différence pourrait provenir du plus grand nombre parcelles étudiées dans le gradient latitudinal comparé au gradient altitudinal (31 sites contre 11). En effet, l'augmentation du nombre de répétitions permet une meilleure résolution pour la détection des effets des facteurs (Zhou *et al.*, 2011). Nous avons observé une assez forte variabilité entre sites pour la richesse spécifique des communautés fongiques des fines racines (50 à 70% de la variance pour le gradient altitudinal) et cette variabilité, que nous n'avons pas réussi à lier à un facteur de l'environnement, pourrait brouiller la réponse au climat du fait d'un nombre insuffisant de répétitions. D'autre part, le gradient thermique est plus important de 2°C sur le gradient latitudinal comparé au gradient altitudinal (Tableau 1) et l'effet de la

température sur la richesse fongique pourrait être significatif au seuil de 5% dans le cas d'un gradient thermique plus étendu. L'effet positif de la température a par ailleurs été montré sur la richesse et la structure d'autres organismes tels que les animaux, les plantes et les bactéries (Hawkins *et al.*, 2003 ; Bryant *et al.*, 2008 ; Griffiths *et al.*, 2011).

D'autre part, les variables climatiques que nous avons étudiées (température moyenne annuelle et pluviométrie annuelle) pourraient ne pas être les variables les plus adaptées. En effet, le facteur limitant n'est pas forcément le même selon les endroits et selon les saisons. A titre d'exemple, Jump *et al.* (2007) ont montré qu'à 1000 m d'altitude, ce sont les faibles précipitations qui limitent la croissance de *Fagus sylvatica* mais que l'importance de ce facteur diminue avec l'altitude. Il serait intéressant d'utiliser des variables moins intégratives que des variables annuelles car les champignons ont une dynamique saisonnière (Buée *et al.*, 2005 ; Koide *et al.*, 2005 ; Courty *et al.*, 2008). En effet, pour une même température moyenne annuelle, deux sites peuvent très bien avoir des amplitudes de température différentes et ne pas avoir les mêmes durées de conditions défavorables. D'ailleurs, Talley *et al.* (2002) ont montré que les variables environnementales tel que le nombre de jours défavorables en terme de température et précipitations sont de meilleures variables prédictives de la richesse fongique que des variables climatiques moyennées sur l'année et Vacher *et al.*, 2008 utilisent également les température estivales et hivernales ainsi que les précipitations printanière pour estimer la richesse en parasites fongiques. En complément de variables moins intégratives, il existe également des variables composites, plus difficile à mesurer, telles que l'évapotranspiration annuelle ou la productivité qui intègrent à la fois la température et la disponibilité en eau. Notamment Hawkins *et al.* (2003) concluent que c'est l'interaction entre les variables liées à l'énergie (température) et à l'eau qui expliquent les patrons globaux de diversité chez les plantes et les animaux. Toutefois, dans les régions tempérées, au dessus de N 30°, comme dans le cas de nos gradients (Tableau 1), la température est le plus souvent, mais pas exclusivement, la variable explicative de la richesse spécifique. Les forts gradients de précipitation des gradients altitudinaux (Tableau 1) ont pu également brouiller la réponse des communautés à la température pour cette deuxième étude.

### **2.1.2. Composition**

A l'inverse de la richesse, la composition des communautés fongiques montre une dépendance aux contraintes climatiques claire pour les deux études sur gradients que nous avons menés. Dans l'étude le long de gradient altitudinaux, la température moyenne annuelle

et les précipitations annuelles étaient fortement et inversement corrélées et il n'est donc pas possible de déterminer laquelle serait liée la composition des communautés fongiques étudiées. Toutefois, l'étude sur le gradient latitudinal montre que ces variables climatiques jouent toutes deux de façon significative sur la composition des communautés fongiques globale et ectomycorhizienne. Ce qui conforte des travaux récents réalisés sur les communautés ectomycorhiziennes en forêts de conifères (Jarvis *et al.*, 2013) ou à partir d'une méta-analyse (Tedersoo *et al.*, 2012). En effet, Jarvis *et al.* (2013) ont étudié les communautés ectomycorhiziennes à partir du système racinaire dans 15 pi nêdes établies sur un gradient climatique. Ils ont montré que la composition de la communauté à l'échelle régionale dépendait fortement des précipitations. De même, la métaanalyse de Tedersoo *et al.* (2012) a montré que les variables température et précipitations influençaient toutes les deux la composition des communautés ectomycorhiziennes à l'échelle continentale.

L'étude d'un groupe aussi large que le sous-règne des Dikarya comprend des organismes très différents au sein d'un même habitat, et l'exploration de la réponse de chacun de ces groupes indépendamment pourrait se révéler judicieuse.

Les résultats de l'étude sur les gradients altitudinaux où la réponse a été étudiée par groupes de champignons suggèrent que la composition des communautés de basidiomycètes serait nettement moins liée aux variables climatiques que celles des communautés d'ascomycètes. A notre connaissance, cela n'a pas déjà été montré dans la littérature et mériterait d'être confirmé.

La question de l'impact de la température sur la richesse et la composition des communautés de champignons présente un intérêt particulier dans le cadre des modifications du climat observées et de celle prévues par les météorologues. Nos résultats suggèrent qu'un réchauffement climatique pourrait ne pas directement affecter la richesse globale des communautés fongiques associées au hêtre, que ce soient les communautés telluriques ou celles de la phyllosphère. Par contre, dans la mesure où les conditions climatiques contrôlent la diversité des plantes (Hawkins *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2007), les communautés fongiques pourraient être affectées indirectement via les modifications des communautés végétales (diversité, productivité). Dans le cas précis du hêtre, Badeau *et al.* (2004) prévoient notamment une forte régression de la présence du hêtre en France laissant supposer une disparition de cette essence dans la moitié Sud Ouest à l'horizon 2100. Ceci aurait clairement

un impact sur la répartition des champignons les plus spécifiquement associés à cette espèce et qui possèdent un spectre d'hôte étroit.

## **2.2. Relation aux variables édaphiques**

### **2.2.1. Richesse**

La richesse des communautés de champignons étudiées était significativement liée au pH du sol dans l'étude le long du gradient latitudinal uniquement. Pourtant, les gammes de pH du sol étaient relativement larges dans les deux études sur gradients (Tableau 1). La relation entre richesse fongique et pH a été précédemment étudiée (Ferris *et al.*, 2000 ; Rousk *et al.*, 2010 ; Thoms *et al.*, 2010) mais les résultats ne permettent pas de dégager une relation claire. Cette relation pourrait notamment dépendre du groupe de champignon considéré. Pourtant ce facteur est un des facteurs clés expliquant la diversité de nombreux groupes d'organismes telles que les plantes ou les communautés bactériennes. Ainsi, un consensus semble émerger sur le fait que la richesse bactérienne serait positivement corrélée au pH (Fierer & Jackson, 2006 ; Bryant *et al.*, 2008 ; Lauber *et al.*, 2009 ; Rousk *et al.*, 2010). A ce jour, aucun consensus ne semble avoir lieu concernant les champignons. Ainsi, d'autres études explorant la diversité fongique en fonction du pH sont nécessaires pour comprendre la nature de cette relation.

### **2.2.2. Composition**

Le pH est lié à la composition des communautés fongiques et ectomycorhiziennes et nos résultats suggèrent que ce facteur serait plus important que les conditions climatiques pour la structuration de la communauté fongique tellurique. En effet, les résultats de nos deux études sur gradients environnementaux convergent à montrer que le pH est significativement corrélé à l'axe 1 des AFC mais pas à l'axe 2. Cette conclusion est valable pour la communauté fongique globale et la communauté ectomycorhizienne. Cette relation au pH confirme les résultats de Wubet *et al.* (2012) mais n'est pas conforme aux résultats rapportés par Lauber *et al.* (2008) qui ont montré que la composition des communautés fongiques était surtout liée au taux de phosphore et au ratio C:N du sol. Par contre, Wubet *et al.* (2012) ont également montré que la composition des communautés ascomycètes, basidiomycètes et des champignons EcM est liée au pH, à la teneur en carbone et à la texture du sol et Meng *et al.*

(2013) ont montré que les glomérromycètes étaient étroitement liés aux teneurs en carbone, azote et eau du sol. Le pH serait également primordial dans la structuration des communautés bactériennes à l'échelle locale (Baker *et al.*, 2009), régionale et continentale (Fierer & Jackson, 2006 ; Lauber *et al.*, 2008 ; Lauber *et al.*, 2009 ; Griffiths *et al.*, 2011).

Contrairement aux communautés fongiques des fines racines, celles de la phyllosphère sont beaucoup plus liées à la température (et/ou précipitations) et dépendent peu du pH du sol, pourtant très lié à la richesse minérale des sols et donc à la qualité du feuillage. Une hypothèse pouvant expliquer cette différence de comportement est que les champignons telluriques seraient moins soumis aux variations climatiques que les champignons de la phyllosphère du fait de leur localisation dans un milieu tamponné comme le sol qui les protège des changements brutaux du climat et qui atténue l'amplitude des variations de température par exemple.

### **3. La détection des oomycètes: des difficultés à surmonter**

La détection et l'identification des espèces de *Phytophthora* et de *Pythium* restent techniquement limitantes et la connaissance de l'écologie de ces organismes en est fortement impactée. Pour chacune des trois études composant cette thèse, un vol et s'intéressait aux communautés de *Phytophthora* et *Pythium*. Les résultats n'ont été présentés que pour la première étude. En effet, les résultats des études sur les gradients altitudinaux et latitudinaux ont été très décevants et ne sont pas présentés. L'étude préliminaire fait partie des premières à 1) s'intéresser aux assemblages d'oomycètes pathogènes en milieu forestier et à 2) utiliser les outils de séquençage haut-débit pour la détection de ces organismes. Quelques oomycètes ont été identifiés, ce qui est concordant avec le faible nombre d'espèces détectées en forêt (Hansen & Delatour, 1999 ; Camy *et al.* 2003, Jung, 2009, Gómez-Aparicio *et al.*, 2012). Vannini *et al.* (2013) ont très récemment rapporté qu'ils n'avaient pas identifié plus d'une quinzaine de *Phytophthora*, associés à 79 arbres dans deux châtaigneraies italiennes, par les mêmes approches d'amplification et séquençage haut débit que celles que nous avons utilisées.

De plus, les assignations taxonomiques qui ont été réalisées sont à prendre avec précaution vu la faible variabilité de l'ITS1 au sein du genre *Phytophthora* (Kang *et al.*, 2010, Vettraino *et al.*, 2012). Des MOTU correspondant à des *Phytophthora* et des *Pythium* ont été détectées sur la placette de Lignéville (Vosges) en décembre 2009 mais n'ont plus été détectées lors de l'échantillonnage de juillet 2010. Ceci pourrait traduire un effet saisonnier car il a été montré

par piégeage que la détection des espèces de *Phytophthora* pouvait fortement dépendre de la saison, certaines espèces étant détectées plutôt en hiver et d'autre plutôt au printemps ou en été (Camy *et al.* 2003).

Plusieurs hypothèses liées aux difficultés techniques peuvent être émises pour expliquer ces résultats décevants. Notamment, en plus de l'échantillonnage de Décembre peu propice pour les *Phytophthora*, les amorces utilisées manquent de spécificité envers ce groupe. En effet, seulement 0.8% des séquences obtenues avec le couple d'amorce ITS6-ITS7 ont pu être classées comme appartenant à des *Phytophthora* ou *Pythium*. Une nouvelle amorce sens oom18S, dessinée par T. Cordier en 2010 et non encore décrite dans littérature, a permis de pallier au manque de spécificité pour ces deux genres oomycètes. Il s'est avéré que le côté 5' de cette nouvelle amorce oom18S partage cinq nucléotides en commun avec le côté 3' de l'amorce 18Ph2F publiée par Scibetta *et al.* (2012) pour la détection des *Phytophthora*. Plus de séquences affiliées à des oomycètes ont pu être obtenues avec l'amorce oom18S (Bikindou, 2012, Master1, données non présentées), mais les résultats restent insuffisants pour les études de communautés. Sur les parcelles des gradients altitudinaux, les oomycètes étaient présents sur 9 des 11 sites (9 sites avec *Pythium* et 3 avec *Phytophthora*) et peu d'OTU ont été détectés. Pour l'étude sur le gradient latitudinal, l'utilisation de oom18S n'a permis une amplification que de 32% des arbres étudiés et 39% des sites ne présentaient aucun arbre avec amplification d'ITS oomycètes (Kamoune, 2012, Master 2, données non présentées). Au vu des résultats, les amplicons n'ont pas été envoyés au pyroséquençage. L'utilisation d'amorces mieux adaptées et de PCR emboîtée n'a donc pas permis de résoudre les problèmes lors de cette thèse. L'équipe de David Cooke planifie de développer en 2013 un couple d'amorces ciblant les oomycètes (Cooke, communication personnelle).

D'autres hypothèses liées à une faible abondance réelle peuvent également être proposées. En effet, la quantité d'ADN pour une espèce de *Phytophthora* ou *Pythium* atteint un ordre de grandeur entre  $10^{-3}$  à  $8 \text{ ng.g}^{-1}$  de sol, alors que l'ordre de grandeur est de 100 à 1000 fois supérieur pour une espèce de champignon (Guidot *et al.*, 2003 ; Lievens *et al.*, 2006 ; Schroeder *et al.*, 2006 ; Hortal *et al.*, 2008 ; Pavon *et al.*, 2008 ; De la Varga *et al.*, 2012 ; Parladé *et al.*, 2013). Cette faible abondance de l'ADN d'oomycètes pathogènes dans le sol pourrait induire que des amorces généralistes ne s'hybrident pas de manière suffisamment efficace à l'ADN matrice de cette famille d'organismes. La technique de PCR emboîtée pouvant normalement remédier à cette faible représentativité n'a pas permis de résoudre le problème. Alors que les oomycètes regroupent des agents pathogènes telluriques très importants, très peu d'études ont été publiées ces 10 dernières années donnant des estimations

de la quantité d'ADN dans le sol pour ces organismes. Cela montre que même leur détection dans le sol par des approches moléculaires ciblées reste problématique.

Le nombre élevé d'échantillons avec absence de détection de *Phytophthora* ou *Pythium* pourrait aussi s'expliquer par une présence beaucoup plus sporadique que celle des champignons mycorhiziens. Ceci est montré par de nombreux travaux en milieu forestier utilisant le piégeage. Par exemple, Balci *et al.* (2007) qui ont étudié les communautés de *Phytophthora* en chênaie n'ont obtenu que 21% d'isollements positifs dans une étude portant sur 825 arbres avec 2kg de sol échantillonnés par arbre. Il est aussi connu que les *Phytophthora* sont absents des sols forestiers les plus acides (Jung *et al.*, 2005). De plus, il a été observé que le sol aurait une propriété de suppression des maladies par laquelle les bactéries joueraient un rôle important. Ces résultats alimentent donc les arguments de certains partisans de la nouvelle expression 'everything is not everywhere' (Peay *et al.*, 2010; Rout & Callaway, 2012). La levée des difficultés techniques pourraient à l'avenir permettre de tester l'hypothèse que les *Phytophthora* seraient non ubiquistes mais plutôt confinés dans des niches peu fréquentes.

## CONCLUSIONS

Le séquençage haut-débit a révolutionné différentes disciplines scientifiques, parmi lesquelles l'écologie microbienne, et commence à apporter un nouvel éclairage dans certains domaines, notamment sur la distribution et les facteurs de structuration des communautés fongiques à de grandes échelles spatiales.

Nous avons montré que l'hétérogénéité locale, particulièrement marquée en milieu forestier, nécessitait de maintenir une pression d'échantillonnage conséquente au niveau d'une parcelle afin de couvrir au mieux la communauté fongique tellurique. Par ailleurs, afin d'étudier plus spécifiquement les communautés de champignons ectomycorhiziens, il semble que l'utilisation directe du sol pour les extractions d'ADN génomique environnemental peut se substituer à celle des racines fines, qui nécessite une mise en œuvre plus fastidieuse d'un point de vue méthodologique. Mais, si l'approche méthodologique est allégée, il est impératif de travailler en amont sur le développement de bases de données bien assignées et couplées à différents traits écologiques, tels que le statut écologique (saprophyte, endophyte, mycorhizien, pathogène...). Nous n'avons pas mis en évidence un effet direct de la température sur la richesse des communautés fongiques globales ; mais nos résultats montrent

clairement que la composition des communautés est fortement affectée par le climat. Par ailleurs, nous avons également constaté que des groupes écologiques et taxonomiques différents pouvaient répondre de même manière variables aux contraintes environnementales. Comme cela a été récemment publié pour des communautés fongiques associées aux aulnaies (Polme *et al.*, 2013), d'autres travaux de même nature, en l'occurrence en pinède (Rincon *et al.*, non publié), pourront étayer nos résultats obtenus en hêtraie. En effet, dans le cadre du contrat européen BACCARA, une étude, en collaboration avec le CSIC de Madrid (Dr. Ana Rincon), a été conduite sur les communautés fongiques associées aux racines fines du pin sylvestre le long de gradients altitudinaux localisés en France et en Espagne. Les résultats préliminaires sont très semblables aux nôtres, avec en particulier une absence d'effet du climat sur la richesse des communautés fongiques alors que l'effet sur la composition est fort. La multiplication dans le futur de ce type d'étude devrait permettre de réaliser des méta-analyses incluant des études sur des communautés associées à une seule essence. Concernant les oomycètes pathogènes forestiers, un travail significatif reste à entreprendre pour améliorer la détection moléculaire de ces organismes impliqués dans de nombreux dégâts sur les végétaux, mais dont la distribution semble plus sporadique ou pour lesquels la quantité relative d'ADN génomique dans les matrices environnementales reste très faible.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agerer R, 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107–114.
- Aguilera G, Marthey S, Chiapello H, Lebrun MH, Rodolphe F, Fournier E, Gendraud-Jacquemard A, Giraud T, 2008. Assessing the performance of single-copy genes for recovering robust phylogenies. *Syst Biol.* 57:613-27.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD, 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19:5555-5565.
- Anderson IC, Cairney JW, 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6:769-79.
- Anderson IC, Campbell CD, Prosser JI, 2003. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environ. Microbiol.* 5:36-47.
- Aponte C, Garcia LV, Maranon T, Gardes M, 2010. Indirect host effect on ectomycorrhizal fungi: Leaf fall and litter quality explain changes in fungal communities on the roots of co-occurring Mediterranean oaks. *Soil Biol. & Biochem.* 42:788-796.
- Arbeli Z & Fuentes CL, 2007. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. *FEMS Microbiol. Lett.* 272:269–275.
- Arcate JM, Karp MA, Nelson EB, 2006. Diversity of Peronosporomycete (Oomycete) communities associated with the rhizosphere of different plant species. *Microbial Ecology* 51:36-50.
- Arfi Y, Buée M, Marchand C, Levasseur A, Record E, 2012. Multiple markers pyrosequencing reveals highly diverse and host specific fungal communities on the mangrove trees *A. marina* and *R.stylosa*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79:433-444.
- Bååth E & Anderson TH, 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology & Biochemistry* 35:955–963.
- Badeau V, Dupouey J-L, Cluzeau C, Drapier J, Le Bas C, 2004. Modélisation et cartographie de l'aire climatique potentielle des grandes essences forestières françaises. In Rapport final du projet CARBOFOR « Séquestration de carbone dans les grands écosystèmes forestiers en France » (éd. D. Lousteau), Bordeaux-Pierroton : INRA, pp. 101-113
- Badeau V, Dupouey J-L, Cluzeau C, Drapier J, 2007. Aires potentielles de répartition des essences forestières d'ici 2100. Rendez-vous techniques de l'ONF, hors-série n° 3 « Forêts et milieux naturels face aux changements climatiques » p62-67.
- Bahram M, Pölme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo L, 2012. Regional and local patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytol.* 193:465-73.
- Baker KL, Langenheder S, Nicol GW, Ricketts D, Killham K, Campbell CD, Prosser JI, 2009. Environmental and spatial characterisation of bacterial community composition in soil to inform sampling strategies. *Soil Biology & Biochemistry* 41:2292–2298.
- Bakker MR, Turpault M-P, Huet S, Nys C, 2008. Root distribution of *Fagus sylvatica* in a chronosequence in western France. *Journal of Forest Research* 13: 176-184.

- Balci Y, Balci S, Eggers J, MacDonald WL, Juzwik J, Long RP, Gottschalk KW, 2007. *Phytophthora* spp. Associated with Forest Soils in Eastern and North-Central U.S. Oak Ecosystems. *Plant Disease* 91:705-710.
- Baldrian P, Vetrovsky T, Cajthaml T, Dobiasova P, Petrankova M, Snajdr J, Eichlerov I, 2013. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. *Fungal Ecology*, 6:1-11.
- Bardgett RD, Yeates GW, Anderson JM, 2005. Patterns and determinants of soil biological diversity. In : Bardgett RD, Usher M B, Hopkins DW, 2005 *Biological diversity and function in soils*. Cambridge University Press p100-118.
- Bass D & Richards TA, 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity 'on Earth and in the ocean'. *Fungal Ecology Reviews* 25:159-164.
- Baumgartner K, Coetzee MP, Hoffmeister D, 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Mol. Plant Pathol.* 12:515-34.
- Bazzicalupo AL, Balint M, Schmitt I, 2013. Comparison of ITS1 and ITS2 rDNA in 454 sequencing of hyperdiverse fungal communities. *Fungal Ecology*, 6:102-109.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W, 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:99–108.
- Belbahri L, McLeod A, Paul B, Calmin G, Moralejo E, Spies CF, Botha WJ, Clemente A, Descals E, Sánchez-Hernández E, Lefort F, 2008. Intraspecific and within-isolate sequence variation in the ITS rRNA gene region of *Pythium mercuriale* sp. nov. (Pythiaceae). *FEMS Microbiol. Lett.* 284:17-27.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H, 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189.
- Benson DM, 1982. Cold inactivation of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 72:560-563.
- Berry D, Ben Mahfoudh K, Wagner M, Loy A, 2011. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7846-9.
- Bever JD, Schultz PA, Pringle A, Morton JB, 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51:923-932.
- Bidartondo MI, 2008. Preserving accuracy in GenBank. *Science* 319:1616.
- Bik HM, Porazinska DL, Creer S, Caporaso JG, Knight R, Thomas WK, 2012. Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* 27:233-243.
- Bikindou L, 2012. Metabarcoding : comparaison de deux stratégies d'amplification de la région ITS pour l'étude des micro-organismes eucaryotes forestiers. Mémoire de stage de Master 1 Microbiologie. Université de Lorraine.
- Binladen J, Gilbert MT, Bollback JP, Panitz F, Bendixen C, Nielsen R, Willerslev E, 2007. The use of coded PCR primers enables high-throughput sequencing of multiple homolog amplification products by 454 parallel sequencing. *PLoS One* 2:197.
- Bjorbækmo MF, Carlsen T, Brysting A, Vrålstad T, Høiland K, Ugland KI, Geml J, Schumacher T, Kauserud H, 2010. High diversity of root associated fungi in both alpine and arctic *Dryas octopetala*. *BMC Plant Biol.* 10:244.
- Blaalid R, Carlsen T, Kumar S, Halvorsen R, Ugland KI, Fontana G, Kauserud H, 2012. Changes in the root-associated fungal communities along a primary succession gradient analysed by 454 pyrosequencing. *Mol. Ecol.* 21:1897-1908.
- Blaalid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H, 2013. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* 13:218-224.

- Blair JE, Coffey MD, Park S-Y, Geiser DM, Kang S, 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45:266-277.
- Blaxter M, Mann J, Chapman T, Thomas F, Whitton C, Floyd R, Abede E, 2005. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360:1935-1943.
- Bolte A, Czajkowski T, Kompa T, 2007. The north-eastern distribution range of European beech — a review. *Forestry* 80:413-429.
- Borcard D, Gillet F, Legendre P, 2011. *Numerical Ecology with R.* Springer Ed. 306 pages.
- Brasier CM, 2009. *Phytophthora* biodiversity: how many *Phytophthora* species are there? In: Goheen EM, Frankel SJ (tech. coords.), *Phytophthoras in forests and natural ecosystems. Proceedings of the fourth meeting of the International Union of Forest Research Organizations (IUFRO) Working Party S07.02.09. General Technical Report PSW-GTR-221.* Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station, pp. 101-115.
- Brasier CM, Rose J, Gibbs JN, 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* 44:999–1007.
- Bridge PD, Spooner BM, Roberts PJ, 2004. Reliability and use of published sequence data. *New Phytologist* 161:15–17.
- Broders KD, Wallhead MW, Austin GD, Lipps PE, Paul PA, Mullen RW, Dorrance AE, 2009. Association of soil chemical and physical properties with pythium species diversity, community composition, and disease incidence. *The American Phytopathological Society* 99:957-967.
- Bruns TD & Gardes M, 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi--taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. *Mol Ecol.* 2:233-42.
- Bruns TD, 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 170:63-73.
- Bruns TD, Arnold AE, Hughes KW, 2008. Fungal networks made of humans: UNITE, FESIN, and frontiers in fungal ecology. *New Phytologist* 177:586–588.
- Bryant JA, Lamanna C, Morlon H, Kerkhoff AJ, Enquist BJ, Green JL, 2008. Microbes on mountainsides: Contrasting elevational patterns of bacterial and plant diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:11505-11511.
- Buée M, Vairelles D, Garbaye J, 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in a beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15:235–245.
- Buée M, Courty P-E, Le Tacon F, Garbaye F, 2006. Ecosystèmes forestiers : diversité et fonction des champignons. *Biofutur* 268:42-45.
- Buée M, Reich M, Murat C, Morin E, Nilsson RH, Uroz S, Martin F, 2009. 454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytologist* 184:449–456.
- Buée M, Maurice J-P, Zeller B, Andrianarisoa S, Ranger J, Courtecuisse R, Marcais B, Le Tacon F, 2011. Influence of tree species on richness and diversity of epigeous fungal communities in a French temperate forest stand. *Fungal Ecology* 4: 22-31.
- Burdon JJ, Thrall PH, Ericson L, 2006. The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:19-39.
- Burke DJ, Lopez-Gutierrez JC, Smemo KA, Chan CR, 2009. Vegetation and soil environment influence the spatial distribution of root-associated fungi in a mature beech-maple forest. *Applied and Environmental Microbiology* 75:7639-7648.

- Camy C, Delatour C, Marçais B, 2003. Relationships between soil factors, *Quercus robur* health, *Collybia fusipes* root infection and *Phytophthora* presence. *Ann.For.Sci* 60:419-426.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.*, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336.
- Carlsen T, Aas AB, Lindner D, Vralstad T, Schumacher T, Kausrud H, 2012. Don't make a mista(g)ke: is tag switching an overlooked source of error in amplicon pyrosequencing studies? *Fungal Ecology* 5:747-749.
- Castro HF, Classen AT, Austin EE, Norby RJ, Schadt CW, 2010. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:999-1007.
- Chandelier A, Ivors K, Garbelotto M, Zini J, Laurent F, Cavelier M, 2006. Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*. *Bulletin OEPP/EPPO* 36:409-414.
- Chu H, Fierer N, Lauber CL, Caporaso JG, Knight R, Grogan P, 2010. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. *Environ. Microbiol.* 12:2998-3006.
- Clemmensen KE, Michelsen A, Jonasson S, Shaver GR, 2006. Increased ectomycorrhizal fungal abundance after long-term fertilization and warming of two arctic tundra ecosystems. *New Phytol.* 171:391-404.
- Clemmensen KE, Bahr A, Ovaskainen O, Dahlberg A, Ekblad A, Wallander H, Stenlid J, Finlay RD, Wardle DA, Lindahl BD, 2013. Roots and associated fungi drive long-term carbon sequestration in boreal forest. *Science* 339:1615.
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM, 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetic Biology* 30:17-32.
- Cooke DEL, Schena L and Cacciola SO, 2007. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* 89:13-28.
- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Fabreguettes O, Desprez-Loustau M-L, Vacher C, 2012. The composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech (*Fagus sylvatica* L.) varies significantly along an elevation gradient. *New Phytologist* 196:510-519.
- Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Desprez-Loustau M-L, Vacher C, 2012. Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology* 5:509-520.
- Cordier T., 2012. Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique. Thèse de doctorat.
- Courty PE, Franc A, Pierrat JC, Garbaye J, 2008. Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology* 74:5792-5801.
- Courty P-E, Buée M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault M-P, Uroz S, Garbaye J, 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biology & Biochemistry* 42:679-698.
- Cox F, Barsoum N, Bidartondo MI, Borja I, Lilleskov E, Nilsson LO, Rautio P, Tubbu K, Vesterdal L, 2010. A leap forward in geographic scale for forest ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* 67:200.
- Dahlberg A, 2001. Community ecology of ectomycorrhizal fungi: an advancing interdisciplinary field. *New Phytologist* 150:555-562.
- Defosse E, Courbaud B, Marçais B, Thuiller W, Granda E, Kunstler G, 2011. Do interactions between plant and soil biota change with elevation? A study on *Fagus sylvatica*. *Biol Lett.* 7:699-701.

- De la Varga H, Águeda B, Martínez-Peña F, Parladé J, 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
- Delatour C, 2001. Phytophthoras and oaks in Europe. In 'Phytophthora in Forests and Natural Ecosystems'. 2nd International IUFRO Working Party 7.02.09 Meeting, Albany, W. Australia 30th Sept.- 5th Oct 2001 Eds. JA McComb, GE StJ Hardy and IC Tommerup (Murdoch University Print) pp78-88.
- Dennis PG, Rushton SP, Newsham KK, Lauducina VA, Ord VJ, Daniell TJ, O'donnell AG, Hopkins DW, 2012. Soil fungal community composition does not alter along a latitudinal gradient through the maritime and sub-Antarctic. Fungal Ecology 5:403-408.
- Deslippe JR, Hartmann M, Mohn WW, Simard SW, 2011. Long-term experimental manipulation of climate alters the ectomycorrhizal community of *Betula nana* in Arctic tundra. Global Change Biology 17:1625-1636.
- Dickie IA, Xu B, Koide RT, 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. New Phytologist 156:527–535.
- Dickie IA, 2010. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. New Phytol. 188:916-918.
- Diedhiou AG, Dupouey J-L, Buée M, Dambrine E, Laüt L. Garbaye J, 2009. Response of ectomycorrhizal communities to past Roman occupation in an oak forest. Soil Biology & Biochemistry 41:2206–2213.
- Douhan GW, Huryn KL, Douhan LI, 2007. Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. Mycologia 99:812-9.
- Drenovsky RE, Steenwerth KL, Jackson LE, Scow KM, 2010. Land use and climatic factors structure regional patterns in soil microbial communities. Global Ecol. Biogeogr. 19:27–39.
- Drenth A, Wagels G, Smith B, Sendall B, O'Dwyer C, Irvine G, Irwin JAG, 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. Australasian Plant Pathology, 35:147–159.
- Druebert C, Lang C, Valtanen K, Polle A, 2009. Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. Plant Cell Environ. 32:992-1003.
- Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26:2460-2461.
- Egli S, Ayer F, Peter M, Eilmann B, Rigling A, 2010. Is forest mushroom productivity driven by tree growth growth? Results from a thinning experiment. Ann. For. Sci. 67:509.
- Erwin DC & Ribeiro OK, 1996. Phytophthora diseases worldwide. APS Press, St Paul (Minnesota) pp562.
- Ferris R, Reace AJ, Newton AC, 2000. Macrofungal communities of lowland Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten.) plantations in England: relationships with site factors and stand structure. Forest Ecology and Management 131:255-267.
- Fichtner EJ, Lynch SC, Rizzo DM, 2007. Detection, distribution, sporulation, and survival of *Phytophthora ramorum* in a California redwood-tanoak forest soil. Ecology and Epidemiology 97:1366-1375.
- Fierer N, Jackson RB, 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proc. Natl. Acad. Sci. 103:626–631.
- Fierer N, 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: Accessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to Organisms and Genomes and Back. K. Zengler (editor). ASM Press, Washington DC p95-115.

- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC, 2009. Global patterns in belowground communities. *Ecol. Lett.* 12:1238–1249.
- Fierer N, McCain CM, Meir P, Zimmermann M, Rapp JM, Silman MR, Knight R, 2011. Microbes do not follow the elevational diversity patterns of plants and animals. *Ecology* 92:797-804.
- Finchel T & Finlay BJ, 2004. The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience* 54:777-784.
- Frankland J, 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycol. Res.* 102:1-15.
- Gardes M & Bruns TD, 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
- Gaston KJ, 2000. Global patterns in biodiversity. *Nature* 405:220–227.
- Gazis R, Rehner S, Chaverri P, 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Mol. Ecol.* 20:3001-3013.
- Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ, 2006. Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* 170:381-390.
- Gilbert GS, 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:13–43.
- Gilles A, Meglécz E, Pech N, Ferreira S, Malausa T, Martin JF, 2011. Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics* 12:245.
- Giongo A, Crabb DB, Davis-Richardson AG, Chauliac D, Mobberley JM, Gano KA, Mukherjee N, Casella G, Roesch LF, Walts B, Riva A, King G, Triplett EW, 2010. PANGEA: pipeline for analysis of next generation amplicons. *ISME J.* 4:852-861.
- Gómez-Aparicio L, Ibanez B, Serrano MS, De Vita P, Avila JM, Perez-Ramos IM, Garcia LV, Sanchez ME, Maranon T, 2012. Spatial patterns of soil pathogens in declining Mediterranean forests: implications for tree species regeneration. *New Phytologist* 194:1014-1024.
- Gómez-Hernández M, Williams-Linera G, Guevara R, Lodge DJ, 2012. Patterns of macromycete community assemblage along an elevation gradient: options for fungal gradient and metacommunity analyses. *Biodivers. Conserv.* 21:2247–2268.
- Gonzalez JM, Portillo MC, Belda-Ferre P, Mira A, 2012. Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One* 7:29973.
- Gorzalak MA, Hambleton S, Massicotte HB, 2012. Community structure of ericoid mycorrhizas and root-associated fungi of *Vaccinium membranaceum* across an elevation gradient in the Canadian Rocky Mountains. *Fungal ecology* 5:36-45.
- Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver I, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ, 2004. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature* 432:747-750.
- Griffiths RI, Thomson BC, James P, Bell T, Bailey M, Whiteley AS, 2011. The bacterial biogeography of British soils. *Environ Microbiol.* 13:1642-1654.
- Grünwald NJ, Martin FN, Larsen MM, Sullivan CM, Press CM, Coffey MD, Hansen EM, Parke JL, 2011. Phytophthora-ID.org: A sequence-based Phytophthora identification tool. *Plant Disease* 95:337-342.
- Grünwald NJ, Goss EM, Press CM, 2008. *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. *Mol. Plant. Pathol.* 9:729-740.

- Guidot A, Debaud JC, Effosse A, Marmeisse R, 2003. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytol.* 161:539–547.
- Hansen E & Delatour C, 1999. *Phytophthora* species in oak forest of north-east France. *Ann. For. Sci.* 56:539–547.
- Hawkes CV, Kivlin SN, Rocca JD, Huguet V, Thomsen MA, Suttle KB, 2011. Fungal community responses to precipitation. *Global Change Biology* 17:1637-1645.
- Hawkins BA, Field R, Cornell HV, Currie DJ, Guégan JF, Kaufman DM, *et al.*, 2003. Energy, water, and broad-scale geographic patterns of species richness. *Ecology* 84:3105–3117.
- Hendrix FF, Campbell J, Campbell WA, 1973. Pythiums as plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 11:77-98.
- Hibbett *et al.*, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research* 111:509-547.
- Hibbett DS, Ohman A, Kirk PM, 2009. Fungal ecology catches fire. *New Phytol.* 184:279–282.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk PM, Nilsson RH, 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biology Reviews* 25:38-47.
- Hillebrand H & Azovsky AL, 2001. Body size determines the strength of the latitudinal diversity gradient. *Ecography* 24:251-256.
- Hillebrand H, 2004. On the generality of the latitudinal diversity gradient. *American Naturalist* 163:192–211.
- Hong S, Bunge J, Leslin C, Jeon S, Epstein SS, 2009. Polymerase chain reaction primers miss half of rRNA microbial diversity. *ISME J.* 3:1365-1373.
- Hortal S, Pera J, Parladé J, 2008. Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18:69–77.
- Horton TR & Bruns TD, 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10:1855–1871.
- Hughes KW, Petersen RH, Lickey EB, 2009. Using heterozygosity to estimate a percentage DNA sequence similarity for environmental species' delimitation across basidiomycete fungi. *New Phytol.* 182:795-798.
- Huse SM, Huber JA, Morrison HG, Sogin ML, Welch DM, 2007. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biol.* 8:R143.
- Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML, 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ. Microbiol.* 12:1889-1898.
- Ihrmark K, Bödeker IT, Cruz-Martinez K, Friberg H, Kubartova A, Schenck J, Strid Y, Stenlid J, Brandström-Durling M, Clemmensen KE, Lindahl BD, 2012. New primers to amplify the fungal ITS2 region--evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82:666-677.
- Ishida T, Nara K, Hogetsu T, 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight hosts species in mixed conifer-broad leaf forests. *New Phytologist* 174:430–440.
- Izzo A, Agbowo J, Bruns TD, 2005. Detection of plot-level changes in ectomycorrhizal communities across years in an old-growth mixed-conifer forest. *New Phytol.* 166:619-629.
- Jarvis S, Woodward S, Alexander IJ, Taylor AFS, 2013. Regional scale gradients of climate and nitrogen deposition drive variation in ectomycorrhizal fungal communities associated with native Scots pine. *Global Change Biology* 19:1688-1696.

- Johnson D, IJdo M, Genney DR, Anderson IC, Alexander IJ, 2005. How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? *Journal of Experimental Botany* 56:1751–1760.
- Johnson D, Anderson IA, Williams A, Whitlock R, Grime JP, 2010. Plant genotypic diversity does not beget root-fungal species diversity. *Plant Soil* 336:107–111.
- Jumpponen A & Jones KL, 2009. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* 184:438–448.
- Jumpponen A, Jones KL, Mattox JD, Yaeger 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.
- Jung T, Blaschke H, Oßwald W, 2000. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease. *Plant Pathology* 49: 706-718
- Jung T, Hudler GW, Jensen-Tracy SL, Griffiths HM, Fleischmann F, Oßwald W, 2005. Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist* 19:159-166.
- Jung T, 2009. Beech decline in Central Europe driven by the interaction between *Phytophthora* infections and climatic extremes. *For. Path.* 39:73–94.
- Kamoune I, 2012. Diversité des champignons et des Oomycètes des sols de hêtraies le long d'un gradient latitudinal. Mémoire de stage de Master 2 Sciences, Technologies, Vie, Terre et Santé. Université de Bourgogne.
- Kanagawa T, 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J. Biosci. Bioeng.* 96:317-323.
- Kang S & Mills AL, 2006. The effect of sample size in studies of soil microbial community structure. *J. Microbiol. Methods.* 66:242-250.
- Kang S, Mansfield MA, Park B, Geiser DM, Ivors KL, Coffey MD, Grünwald NJ, Martin FN, Lévesque CA, Blair JE, 2010. The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. *Phytopathology* 100:732-737.
- Kernaghan G & Harper KA, 2001. Community structure of ectomycorrhizal fungi across an alpine/subalpine ecotone. *Ecography* 24:181–188.
- Kernaghan G, 2005. Mycorrhizal diversity: cause and effect? *Pedobiologia* 49:511-520.
- Kircher M & Kelso J, 2010. High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays.* 32:524-536.
- Klironomos J, Zobel M, Tibbett M, Stock WD, Rillig MC, Parrent JL, Moora M, Koch AM, Facelli JM, Facelli E, Dickie IA, Bever JD, 2011. Forces that structure plant communities: quantifying the importance of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 189:366-370.
- Knight R, Jansson J, Field D, Fierer N, Desai N, Fuhrman JA, Hugenholtz P, van der Lelie D, Meyer F, Stevens R, Bailey MJ, Gordon JI, Kowalchuk GA, Gilbert JA, 2012. Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. *Nat. Biotechnol.* 30:513-520.
- Koide RT, Xu B, Sharda J, 2005. Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol.* 166:251-262.
- Koide RT, Fernandez C, Petprakob K, 2011. General principles in the community ecology of ectomycorrhizal fungi. *Annals of Forest Science* 68:45–55.
- Kõljalg U, Larsson K-H, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Høiland K, Kjølner R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vrålstad T, Ursing BM, 2005. UNITE: a database



- providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 166:1063–1068.
- Konopka A, 2009. What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 3:1223–1230.
- Körner C, 2007. The use of “altitude” in ecological research. *Trends in ecology & evolution* 22:569–574.
- Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F, 2012. The genus *Phytophthora* anno 2012. *Phytopathology* 102:348-364.
- Kunin V, Engelbrekton A, Ochman H, Hugenholtz P, 2009. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* 12:118-23.
- Lakay FM, Botha A, Prior BA, 2007. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J. Appl. Microbiol.* 102:265-273.
- Last FT, Dighton J, Mason PA, 1987. Successions of sheathing mycorrhizal fungi. *Trends Ecol. Evol.* 2:157:161.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N, 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. & Biochem.* 40:2407–2415.
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N, 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5111–5120.
- Leake J, Jahson D, Donnelly D, Muckle G, Boddy L, Read D, 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82:1016–1045.
- Lepieux C, 2012. Alteration bacterienne des minéraux dans les écosystèmes forestiers pauvres en nutriments : analyse des communautés bactériennes et identification des mécanismes impliqués. Thèse de Doctorat.
- Lévesque CA & de Cock WAM, 2004. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycol. Res.* 108:1363–1383.
- Lévesque, 2011. Fifty years of oomycetes—from consolidation to evolutionary and genomic exploration. *Fungal Diversity* 50:35–46.
- Li W, Godzik A, 2006. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22:1658-1659.
- Lievens B, Brouwer M, Vanachter A, Cammue BPA, Thomma B, 2006. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. *Plant Science* 171:155-165.
- Lilleskov EA, Fahey TJ, Horton TR, Lovett GM, 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83:104-115.
- Lilleskov EA, Bruns TD, Horton TR, Taylor DL, Grogan P, 2004. Detection of forest stand-level spatial structure in ectomycorrhizal fungal communities. *FEMS Microbiology Ecology* 49:319-332.
- Lilleskov EA, Hobbie EA, Horton TR, 2011. Conservation of ectomycorrhizal fungi: exploring the linkages between functional and taxonomic responses to anthropogenic N deposition. *Fungal Ecology* 4:174-183.
- Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Högberg P, Stenlid J, Finlay RD, 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytologist* 173:611-620.
- Lindahl BD, Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Carlsen T, Kjølner R, Kõljalg U, Pennanen T, Rosendahl S, Stenlid J, Kauserud H, 2013. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide. *New Phytologist* 199:288-299.

- Liu Y, Zhang Y, He D, CAO, M, Zhu H, 2007. Climatic control of plant species richness along elevation gradients in the Longitudinal Range-Gorge Region. *Chinese Science Bulletin* 52:50-58.
- Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, Pallen MJ, 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat. Biotechnol.* 30:434-439.
- Lugo MA, Ferrero M, Menoyo E, Estévez MC, Siñeriz F, Anton A, 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria diversity along an altitudinal gradient in south american Puna grassland. *Microb. Ecol.* 55:705-713.
- Luis P, Walther G, Kellner H, Martin F, Buscot F, 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol. & Biochem.* 36:1025-1036.
- Manter DK, Weir TL, Vivanco JM, 2010. Negative effects of sample pooling on PCR-based estimates of soil microbial richness and community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2086-2090.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, *et al.*, 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437:376-380.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Catroux G, 2001. DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2354-2359.
- Martin KJ & Rygielwicz PT, 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol.* 5:28.
- Martiny JB, Bohannan BJ, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL, Horner-Devine MC, Kane M, Krumins JA, Kuske CR, Morin PJ, Naeem S, Ovreås L, Reysenbach AL, Smith VH, Staley JT, 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:102-112.
- McGuire KL, Fierer N, Bateman C, Treseder KK, Turner BL, 2012. Fungal community composition in neotropical rain forests: the influence of tree diversity and precipitation. *Microb. Ecol.* 63:804-12.
- Meier CL, Rapp J, Bowers RM, Silman M, Fierer N, 2010. Fungal growth on a common wood substrate across a tropical elevation gradient: temperature sensitivity, community composition, and potential for above-ground decomposition. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1083-1090.
- Meng H, Li K, Nie M, Wan JR, Quan ZX, Fang CM, *et al.*, 2013. Responses of bacterial and fungal communities to an elevation gradient in a subtropical montane forest of China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:2219-2230.
- Miller SL, 1995. Functional diversity of Fungi. *Canadian Journal of Botany* 73:50-57.
- Mitchell JI & Zuccaro A, 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20:62-74.
- Monard C, Gantner S, Stenlid J, 2013. Utilizing ITS1 and ITS2 to study environmental fungal diversity using pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 84:165-175.
- Nagy LG, Petkovits T, Kovács GM, Voigt K, Vágvölgyi C, Papp T, 2011. Where is the unseen fungal diversity hidden? A study of *Mortierella* reveals a large contribution of reference collections to the identification of fungal environmental sequences. *New Phytol.* 191:789-794.
- 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.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U, 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One* 1:e59.

- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson K-H, 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the International Sequence Databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics* 4:193–201.
- Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E, 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol. Lett.* 296:97–101.
- Nilsson RH, Tedersoo L, Abarenkov K, Ryberg M, Kristiansson E, Hartmann M, Schoch CL, *et al.*, 2012. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences. *MycKeys* 4:37–63.
- Niu B, Fu L, Sun S, Li W, 2010. Artificial and natural duplicates in pyrosequencing reads of metagenomic data. *BMC Bioinformatics* 11:187.
- Nocker A, Burr M, Camper AK, 2007. Genotypic Microbial Community Profiling: A Critical Technical Review. *Microbial Ecology* 54:276–289.
- Nogués-Bravo D, Araújo MB, Romdal T, Rahbek C, 2008. Scale effects and human impact on the elevational species richness gradients. *Nature* 453:216–219.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J-M, Vilgalys R, 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5544–5550.
- O'Brien PA, Williams N, Hardy GE, 2009. Detecting Phytophthora. *Crit. Rev. Microbiol.* 35:169–181.
- Orlikowski LB, Oszako T, Szkuta G, 2006. First record on Phytophthora spp. associated with the decline of European beech stand in south-west Poland. *Phytopathol. Pol.* 42:37–46.
- Packer A & Clay K, 2000. Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature* 404:278–281.
- Pandey RV, Nolte V, Schlötterer C, 2010. CANGS: a user-friendly utility for processing and analyzing 454 GS-FLX data in biodiversity studies. *BMC Res. Notes* 3:3.
- Parameswaran P, Jalili R, Tao L, Shokralla S, Gharizadeh B, Ronaghi M, Fire AZ, 2007. A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Res.* 35:e130.
- Parladé J, De la Varga H, De 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
- Pavón CF, Babadoost M, Lambert KN, 2008. Quantification of *Phytophthora capsici* oospores in soil by sieving-centrifugation and real-time polymerase chain reaction. *Plant Disease* 92:143–149.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD, 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58:799–810.
- Peay KG, Bidartondo MI, Arnold AE, 2010. Not every fungus is everywhere: scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. *New Phytol.* 185:878–882.
- Pickles BJ, Genney DR, Potts JM, Lennon JJ, Anderson IC, Alexander IJ, 2010. Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* 186:755–768.
- Pigott CD, 1982. Survival of mycorrhiza formed by *Cenococcum geophilum* Fr. in dry soils. *New Phytologist* 92:513–517.
- Pölme S, Bahram M, Yamanaka T, Nara K, Dai YC, Grebenc T, Kraigher H, Toivonen M, Wang P-H, Matsuda Y, Naadel T, Kennedy, Kõljalg U, Tedersoo L, 2013. Biogeography of ectomycorrhizal fungi associated with alders (*Alnus* spp.) in relation to biotic and abiotic variables at the global Scale. *New Phytologist* 198:1239–1249.

- Polz MF, Cavanaugh CM, 1998. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64:3724–3730.
- Powell JR, Monaghan MT, Öpik M, Rillig MC, 2011. Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. *Mol Ecol.* 20:655-666.
- Pregitzer KS, DeForest JL, Burton AJ, Allen MF, Ruess RW, Hendrick RL, 2002. Fine root architecture of nine North American trees. *Ecol. Monogr.* 72:293–309
- Prosser JI, Bohannon BJ, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, Green JL, Green LE, Killham K, Lennon JJ, Osborn AM, Solan M, van der Gast CJ, Young JP, 2007. The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:384-392.
- Raffaele S & Kamoun S, 2012. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better. *Nature Review Microbiol.* 10:417-430.
- Rahbek C, 1995. The elevational gradient of species richness: a uniform pattern? *Ecography* 18:200–205.
- Rahbek C, 2005. The role of spatial scale and the perception of large-scale species-richness patterns. *Ecology Letters* 8:224–239.
- Rajala T, Peltoniemi M, Pennanen T, Mäkipää R, 2010. Relationship between wood-inhabiting fungi determined by molecular analysis (denaturing gradient gel electrophoresis) and quality of decaying logs. *Can. J. For. Res.* 40:2384–2397.
- Rajala T, Peltoniemi M, Pennanen T, Mäkipää R, 2012. Fungal community dynamics in relation to substrate quality of decaying Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) logs in boreal forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 81:494-505.
- Ranjard L, Lejon DP, Mougél C, Schehrer L, Merdinoglu D, Chaussod R, 2003. Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environ Microbiol.* 5:1111-1120.
- Ranjard L, Dequiedt S, Jolivet C, Saby NPA, Thioulous J, Harmand J, Loisel P, Rapaport A, Fall S, Simonet P, Joffre R, Chemidlin-Prévost Bouré N, Maron P-A, Mougél C, Martin M, Toutain B, Arrouays D, Lemanceau P, 2010. Biogeography of soil microbial communities: a review and a description of the ongoing french national initiative. *Agron. Sustain. Dev.* 30:359–365.
- Reeder J & Knight R, 2009. The ‘rare biosphere’: a reality check. *Nature Methods* 6:636–637.
- Reich M, Kohler A, Martin F, Buée M, 2009. Development and validation of an oligonucleotide microarray to characterise ectomycorrhizal fungal communities. *BMC Microbiology* 9:241.
- Richard F, Moreau P-A, Selsosse M-A, Gardes M, 2004. Diversity and fruiting patterns of ectomycorrhizal and saprobic fungi in an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex* L. *Can. J. Bot.* 82:1711–1729.
- Ricklefs RE & Miller GL, 2000. *Ecology*. Fourth Edition. W.H. Freeman and Company.
- Rinaldi AC, Comadini O, Kuyper TW, 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1–45.
- Rineau F & Garbaye J, 2009. Effects of liming on ectomycorrhizal community structure in relation to soil horizons and tree hosts. *Fungal Ecology* 2:103-109.
- Robideau GP, De Cock AW, Coffey MD, Voglmayr H, Brouwer H, Bala K, *et al.*, 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Mol Ecol Resour.* 11:1002-1011.

- Robinson CH, Miller EJP, Deacon LJ, 2005. Biodiversity of saprotrophic fungi in relation to their functions : do fungi obey the rules ? In: Bardgett RD, Usher M B, Hopkins DW 2005 Biological diversity and function in soils. Cambridge University Press p189-215.
- Rochet J, Moreau PA, Manzi S, Gardes M, 2011. Comparative phylogenies and host specialization in the alder ectomycorrhizal fungi *Alnicola*, *Alpova* and *Lactarius* (Basidiomycota) in Europe. *BMC Evol Biol.* 11:40.
- Roh SW, Abell GCJ, Kim K-H, Nam Y-D, Bae JW, 2010. Comparing microarrays and next generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends in Biotechnology* 28:291–299.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlén M, Nyrén P, 1996. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242:84-89.
- Rosling A, Cox F, Cruz-Martinez K, Ihrmark K, Grelet G-A, Lindahl BD, Menkis A, James TY, 2011. Archaeorhizomycetes : unearthing an ancient class of ubiquitous soil fungi. *Science* 333:876–879.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, *et al.*, 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4:1340–1351.
- Rygiewicz PT, Martin KJ, Tuininga AR, 2000. Morphotype community structure of ectomycorrhizas on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb. Franco) seedlings grown under elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and temperature. *Oecologia* 124:299–308.
- Scattolin L, Montecchio L, Mosca E, Agerer R, 2008. Vertical distribution of the ectomycorrhizal community in the top soil of Norway spruce stands. *Eur. J. Forest Res.* 127:347–357.
- Schena L, Duncan JM, Cooke DEL, 2008. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* 57:64–75.
- Schindlbacher A, Rodler A, Kuffner M, Kitzler B, Sessitsch A, Zechmeister-Boltenstern S, 2011. Experimental warming effects on the microbial community of a temperate mountain forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 43:1417-1425.
- Schloss PD & Handelsman J, 2006. Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comp. Biol.* 2: e92.
- Schloss PD, Westcott SL, 2011. Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3219-3226.
- Schneegurt MA, Dore SY, Kulpa CF Jr, 2003. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5:1-8.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spougea JL, Levesque AC, Chenb W, Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* 109:6241-6246.
- Schroeder KL, Okubara PA, Tambong JT, Lévesque CA, Paulitz TC, 2006. Identification and quantification of pathogenic *Pythium spp.* from soils in Eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology* 96:637-647.
- Scibetta S, Schena L, Chimento A, Cacciola SO, Cooke DEL, 2012. A molecular method to assess *Phytophthora* diversity in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 88:356-368.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9:83–89.
- Selosse, 2001. Apports des techniques génétiques et moléculaires à la connaissance des communautés et des populations de champignons ectomycorhiziens. *Lejeunia* n°165 23 pages.
- Schmid I, 2002. The influence of soil type and interspecific competition on the fine root system of Norway spruce and European beech. *Basic Appl. Ecol.* 3:339–346.

- Shaw AK, Halpern AL, Beeson K, Tran B, Venter JC, Martiny JB, 2008. It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 10:2200-2210.
- Shendure J & Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26:1135-1145.
- Shi L, Guttenberger M, Kottke I, Hampp R, 2002. The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. *Mycorrhiza* 12:303-311.
- Sikes BA, Cottenie K, Klironomost JN, 2009. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. *Journal of Ecology* 97:1274–1280.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS, 2010. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:779-790.
- Smilauerová M & Smilauer P, 2002. Morphological responses of plant roots to heterogeneity of soil resources. *New Phytologist* 154:703-715.
- Smith SE & Read DJ, 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Staddon PJ, Heinemeyer A, Fitter AH, 2002. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. *Plant and Soil* 244:253–261.
- Stenstrom E, Damm E, Unestam T, 1997. Le rôle des mycorrhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogènes du sol. *Rev. For. Fr.* 49:121-128.
- Straatsma G, Ayer F, Egli S, 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycol. Res.* 105:515-523.
- Tagu D & Moussard C, Eds 2003. *Principes des techniques de biologie moléculaires*. INRA Editions 176 pages.
- Talley SM, Coley PD, Kursar TA, 2002. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Biology* 2:7.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 31:21-32.
- Taylor AFS, 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities: sampling effort and species detection. *Plant and Soil* 244:19–28.
- Tedersoo L, Koljalg U, Hallenberg N, Larsson KH, 2003. Fine scale distribution of ectomycorrhizal fungi and roots across substrate layers including coarse woody debris in a mixed forest. *New Phytologist* 159:153-165.
- 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, Pärtel K, Jairus T, Gates G, Põldmaa K, Tamm H, 2009. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environ. Microbiol.* 11:3166-78.
- Tedersoo L, Nilsson RH, Abarenkov K, Jairus T, Sadam A, Saar I, Bahram M, Bechem E, Chuyong G, Kõljalg U, 2010a. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. *New Phytol.* 188:291-301.
- Tedersoo L, Sadam A, Zambrano M, Valencia R, Bahram M, 2010b. Low diversity and high host preference of ectomycorrhizal fungi in western Amazonia, a neotropical biodiversity hotspot. *ISME J.* 4:465-471.

- Tedersoo L & Nara K, 2010. General latitudinal gradient of biodiversity is reversed in ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 185:351–354.
- Tedersoo L, Bahram M, Jairus T, Bechem E, Chinoya S, Mpumba R, Leal M, Randrianjohany E, Razafimandimbison S, Sadam A, Naadel T, Kõljalg U, 2011. Spatial structure and the effects of host and soil environments on communities of ectomycorrhizal fungi in wooded savannas and rain forests of Continental Africa and Madagascar. *Mol. Ecol.* 20:3071-3080.
- Tedersoo L, Bahram M, Toots M, Diédhiou AG, Henkel TW, Kjølner R, Morris MH, Nara K, Nouhra E, Peay KG, Põlme S, Ryberg M, Smith ME, Kõljalg U, 2012. Towards global patterns in the diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi. *Mol. Ecol.* 21:4160-4170.
- Tedersoo L, Mett M, Ishida TA, Bahram M, 2013. Phylogenetic relationships among host plants explain differences in fungal species richness and community composition in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* doi: 10.1111/nph.12328.
- Terrat S, Christen R, Dequiedt S, Lelièvre M, Nowak V, Regnier T, Bachar D, Plassart P, Wincker P, Jolivet C, Bispo A, Lemanceau P, Maron PA, Mougél C, Ranjard L, 2012. Molecular biomass and MetaTaxogenomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microb. Biotechnol.* 5:135-141.
- Thoirain B, Husson C, Marçais B, 2007. Risk factors for the phytophthora-induced decline of alder in northeastern France. *Phytopathology* 97:99-105.
- Thoms C, Gattinger A, Jacob M, Thomas FM, Gleixner G, 2010. Direct and indirect effects of tree diversity drive soil microbial diversity in temperate deciduous forest. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1558-1565.
- Timling I, Dahlberg A, Walker DA, Gardes M, Charcosset JY, Welker JM, Taylor DL, 2012. Distribution and drivers of ectomycorrhizal fungal communities across the North American Arctic. *Ecosphere* 3:111.
- Toljander JF, Eberhardt U, Toljander YK, Paul LR, Taylor AFS, 2006. Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytologist* 170:873-884.
- Tomlinson JA, Boonham N, Hughes KJD, Griffin RL, Barker I, 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6702–6710.
- Torsvik V & Øvreås L, 2002 Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:240-5.
- Treseder KK, 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO<sub>2</sub> in field studies. *New Phytologist* 164:347–355
- Twieg BD, Durall DM, Simard SW, 2007. Ectomycorrhizal fungal succession in mixed temperate forests. *New Phytologist* 176:437–447.
- Twieg BD, Durall DM, Simard SW, Jones MD, 2009. Influence of soil nutrients on ectomycorrhizal communities in a chronosequence of mixed temperate forests. *Mycorrhiza* 19:305–316.
- Uroz S, Marmeisse R, Buée M, Dessaux Y, Faure D, Geremia R, 2011. De la diversité à la fonction des sols peu anthropisés. *Biofutur* 139:39-43.
- Uroz S, Oger P, Lepleux C, Collignon C, Frey-Klett P, Turpault M-P, 2011b. Bacterial weathering and its contribution to nutrient cycling in temperate forest ecosystems. *Research in Microbiology* 162:820-831.
- Uroz S, Ioannidis P, Lengellé J, Cebren A, Morin E, *et al.* 2013. Functional Assays and Metagenomic Analyses Reveals differences between the microbial communities inhabiting the soil horizons of a Norway spruce plantation. *PLoS ONE* 8: e55929.

- Vacher C, Vile D, Helion E, Piou D, Desprez-Loustau M-L, 2008. Distribution of parasitic fungal species richness: influence of climate versus host species diversity. *Diversity and Distributions* 14:786-798.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol. Evol.* 24:110-117.
- van der Gast CJ, Gosling P, Tiwari B, Bending GD, 2011. Spatial scaling of arbuscular mycorrhizal fungal diversity is affected by farming practice. *Environ. Microbiol.* 13:241-249.
- van der Heijden MG, Bardgett RD, van Straalen NM, 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11:296-310.
- van der Putten WH, 2000. Pathogen-driven forest diversity. *Nature* 404:232-233.
- Vannini A, Bruni N, Tomassini A, Franceschini S, Vettrai AM, 2013. Pyrosequencing of environmental soil samples reveals biodiversity of the *Phytophthora* resident community in chestnut forests. *FEMS Microbiol Ecol.* doi: 10.1111/1574-6941.12132
- Vettrai AM, Barzanti GP, Bianco MC, Ragazzi A, Capretti P, Paoletti E, Luisi N, Anselmi N, Vannini A, 2002. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees. *For. Path.* 32:19-28.
- Vettrai AM, Bonants P, Tomassini A, Bruni N, Vannini A, 2012. Pyrosequencing as a tool for detection of *Phytophthora* species: error rate and risk of false MOTUs. *Letters in Applied Microbiology* 55:390-396.
- Vilgalys, 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 160:1-19.
- Vrålstad T, 2011. ITS, OTUs and beyond—fungal hyperdiversity calls for supplementary solutions. *Mol. Ecol.* 20:2873-2875.
- Wallander H, Johansson U, Sterkenburg E, Durling MB, Lindahl B, 2010. Production of ectomycorrhizal mycelium peaks during canopy closure in Norway spruce. *New Phytologist* 187:1124-1134.
- Wehner J, Antunes PM, Powell JR, Mazukatow J, Rillig MC, 2010. Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia* 53:197-201.
- Wiens JA, 1978. Spatial Scaling in Ecology. *Functional Ecology* 3:385-397.
- Williams N, Hardy GESTJ, O'Brien PA, 2009. Analysis of the distribution of *Phytophthora cinnamomi* in soil at a disease site in Western Australia using nested PCR. *For. Path.* 39:95-109.
- Wollan AK, Bakkestuen V, Kauserud H, Gulden G, Halvorsen R, 2008. Modelling and predicting fungal distribution patterns using herbarium data. *J. Biogeogr.* 35:2298-2310.
- Wolters, V, WL Silver, DE Bignell, DC Coleman, P Lavelle, WH van der Putten, P de Ruiter, J Rusek, DH Wall, DA Wardle, L Brussaard, JM Dangerfield, VK Brown, K Giller, DU Hooper, O Sala, J Tiedje, JA van Veen, 2000. Effects of global changes on above- and belowground biodiversity in terrestrial ecosystems: implications for ecosystem functioning. *BioScience* 50:1089-1098.
- Wu B, Hogetsu T, Isobe K, Ishii R, 2007. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in a primary successional volcanic desert on the southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza* 17:495-506.
- Wubet T, Christ S, Schöning I, Boch S, Gawlich M, Schnabel B, Fischer M, Buscot F, 2012. Differences in soil fungal communities between European beech (*Fagus sylvatica* L.) dominated forests are related to soil and understory vegetation. *PLoS One* 7:e47500.
- Yang H, Zang Y, Yuan Y, Tang J, Chen X, 2012. Selectivity by host plants affects the distribution of arbuscular mycorrhizal fungi: evidence from ITS rDNA sequence metadata. *BMC Evol. Biol.* 12:50.
- Zhou J, Xia B, Treves DS, Wu LY, Marsh TL, O'Neill RV, Palumbo AV, Tiedje JM, 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:326-334.



Zhang W, Parker KM, Luo Y, Wan S, Wallace LL, Hu S, 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Global Change Biology* 11:266-277.

Zhou J, Wu L, Deng Y, Zhi X, Jiang YH, Tu Q, Xie J, Van Nostrand JD, He Z, Yang Y, 2011. Reproducibility and quantitation of amplicon sequencing-based detection. *ISME J.* 5:1303-1313.

Zinger L, Gury J, Alibeu O, Rioux D, Gielly L, Sage L, Pompanon F, Geremia RA, 2008. CE-SSCP and CE-FLA, simple and high-throughput alternatives for fungal diversity studies. *J Microbiol Methods* 72:42-53.

## REMERCIEMENTS

Je remercie Pascale Frey-Klett et Eric Gelhaye d'avoir accepté que je prépare et soutienne cette thèse au sein de l'UMR Interactions Arbres-Microorganismes.

Je tiens à remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'examiner et d'évaluer mon travail: Monique Gardes, Roberto Geremia, Lionel Ranjard et Eric Gelhaye. Je remercie également les membres de mes comités de thèse pour leurs avis et propositions au cours de la thèse : Cécile Robin, Philippe Vandenkoornhuyse et Renaud Ioos.

Je remercie la Région Lorraine, qui est un partenaire financier récurrent dans mon parcours universitaire et qui a donc participé cette fois-ci au financement de ma thèse.

J'adresse mes remerciements les plus reconnaissants à mes directeurs de thèse, Benoit et Marc. Leur implication a été totale et leur encadrement complémentaire. Je les remercie pour cela, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et pour leur accompagnement tout au long de ma thèse pour enrichir ce travail. Ils ont fait preuve d'une grande compréhension pour me laisser gérer (de façon pas toujours idéale) ce projet de thèse. Merci énormément.

Je voudrais remercier les collègues qui ont contribué à ce travail. Merci à Olivier Caël, Cyrille Bach, Xavier Capdevielle, Nicolas Cichoki, Lydia Bousset, Jonathan Tissier, Lindsay Godart, Damien Gardelle, Cindy Dubois et au sein du projet BACCARA, Tristan Cordier, Emmanuel Defossez, Ana Rincon, Ana-Maria Vettraino, Marianna Stradaoli, Ana Zolciak, Johanna Boberg et Juan Santos pour les étapes de collecte et de traitement des échantillons. Merci à Corinne Cruaud et Frédérick Gavory du Génoscope pour la partie pyroséquençage et mise à disposition des séquences. Merci à Cécile Robin et Corinne Vacher pour leur implication dans la relecture de mon deuxième article. Merci particulier à Tristan Cordier pour sa collaboration constante, sincère et efficace.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont contribué à l'avancée de ces travaux par leur enthousiasme et leur réelle implication : Lydie Renard, Livin Bikindou et Ismahane Kamoune.

Je remercie également toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au travers par exemple de discussions, de transfert de compétences et/ou la mise à disposition de matériel. Merci donc à Bénédicte Fabre, Claude Husson, Axelle Andrieux, Pascal Frey, Emmanuelle Morin (La Grande Prêtresse de la Bioinformatique à mes yeux), Juliette Lengellé, Stéphane Uroz, Emilie Tisserant, Jean-Louis Churin, Patrice Vion et Christine Delaruelle. Merci à Nicole et Marie-Claude pour leur aide administrative et leur grande sympathie. Je remercie également Benjamin Pêtre<sup>1</sup> pour toutes ses critiques constructives.

Je voudrais exprimer ici toute ma gratitude envers mes collègues de l'équipe Ecologie. J'ai apprécié tout ce que vous partagez. Il y a tellement de choses que pour synthétiser, je ne mentionne que les pâtisseries mais surtout votre bonne humeur et votre sens de l'humour que j'affectionne particulièrement. Par ces expressions de joie quotidiennes, vous avez apporté de manière collégiale au labo une ambiance propice à mon épanouissement personnel. Vous m'avez toujours soutenu dans les moments difficiles, tout particulièrement Bénédicte, Claude, Olivier et Axelle. Je remercie également Pascale pour ces mots si justes et si précieux à certains moments charnières. A toutes et tous, Merci.

Je salue tous les collègues, des différentes équipes de l'unité IAM, à l'INRA et à la fac des Sciences. Je n'ose pas faire la liste de peur d'oublier quelqu'un. Vous vous reconnaitrez.

I would like to thank Andy Taylor and his team (Susan Jarvis, Roxane Andersen, Rebekka Artz) for their very warm welcome at the Soil Group at the James Hutton Institute in Aberdeen.

Je remercie Pierrick Priault et Damien Blaudez pour m'avoir confié quelques heures d'enseignement.

Je salue également tous mes collègues doctorantes et doctorants et ceux déjà passés Dr. qui ont fait ce bout de chemin avec moi : Cendrella, Vincent, Alice, Josef, le Grand Ben, Yann, Anne, Jennifer, Edgar, PJ, Yohann, Thibault, Emeline, PA, Henri, Fabrice, Michaël, Antoine, Constance, Adeline pour pêle-mêle les discussions, les blagues, les prêts de bureau, les sorties, et tous les trucs. C'était super sympa.

---

<sup>1</sup> a = c(13,5,18,3,9) ; b = rep(c(4,15,21),2) ; c = paste(letters[a],collapse="") ; d = paste(letters[b],collapse="") ; e = paste(c,d,sep=" ") ; gsub("(\\w)(\\w\*)", "\\U\\1\\L\\2", e, perl=T)

Des mentions spéciales à Jaime (Merci pour *P. alni* ! tu m'as manqué pour ma dernière année), à Laurence, à JB pour sa cuisine, au Stéph et à ses parents pour les week-ends dans les Vosges et aux M&M pour les week-ends à Norroy. Un grand Merci pour tout.

Je tiens à remercier les bénévoles de l'ADAS. Merci de vous dévouer pour proposer des activités sociales sur le Centre. Je salue aussi Nathalie et Dominique, c'est un plaisir de vous croiser tous les jours à la cantine.

Naturellement, merci à toutes celles et ceux qui m'ont covoituré sur le chemin du centre.

J'ai été très sensible à tous les encouragements que j'ai reçu tout au long de ma thèse, ceux de mes collègues, amis et famille. Je vous en remercie. Merci notamment à Monsieur Le Tacon, qui m'a fait l'honneur de toujours m'adresser un mot réconfortant.

Enfin, je remercie mes parents de garder la porte toujours ouverte, acceptant mes allers-retours, mes débordements d'enthousiasme et de stress, ma course de tous les matins. Merci pour votre soutien financier et logistique sans failles qui m'ont permis de réaliser des études supérieures dans des conditions excellentes.

## **Diversity and composition of fungi and oomycete communities in beech forest in relation to climatic and edaphic variables: from the stand to the continent**

Forest soils are heterogeneous habitats full of microorganisms. In particular, the filamentous eukaryotes (fungi and oomycetes) exhibit a huge diversity and play essential functions in the dynamic and sustainable growth of the forest ecosystem. However, their diversity and their distribution are poorly known; thus, so are the structuring factors of these microbial communities. The main goals were: (i) use a high-throughput pyrosequencing to study soil microbial communities at a broad geographical scale, and particularly to validate its use for the study of soil forest pathogenic oomycete communities, (ii) study the diversity and structure of fungal and pathogenic oomycetes communities at several spatial scales, (iii) identify possible climatic and edaphic variables structuring these communities and (iv) estimate the possible response of these microbial communities to climatic variation. A pilot study was undertaken at the stand scale. Then, two additional studies were carried out along environmental gradients at the regional and continental scales. The use of the pyrosequencing technique was found appropriate for the fungal communities, but difficulties arose in studying the pathogenic oomycete community. At the stand scale, results suggested the soil to be a valuable substitute for the roots to access the ectomycorrhizal richness and composition using pyrosequencing.

The results along the broad scale gradients suggested that fungal richness may not be affected by climate warming but that the composition would be. Moreover, our work indicated that soil pH is a major factor explaining fungal community composition. The main conclusions are still to be confirmed and deeper knowledge of the response of different fungal phylum, or family, would be required. The detection and thus the diversity estimation of the pathogenic oomycetes in forest soil remains a current challenge.

**Keywords:** fungi, oomycete, mycorrhiza, *Phytophthora*, *Fagus sylvatica*, gradient, temperature, pH, pyrosequencing

## **Diversité et composition des communautés de champignons et d'oomycètes de hêtraies, en relation avec des facteurs climatiques et édaphiques : de la parcelle au continent**

Les sols forestiers sont des habitats hétérogènes, véritables réservoirs de microorganismes. Parmi ces microorganismes, les eucaryotes filamenteux (champignons et oomycètes) sont très divers et jouent un rôle important dans le fonctionnement et la durabilité des écosystèmes forestiers. Leur diversité et leur répartition spatiale à différentes échelles sont encore peu connues et les facteurs qui sous-tendent cette dispersion sont encore peu étudiés. Aussi, les objectifs étaient (i) d'exploiter le séquençage haut-débit pour des études d'écologie microbienne à large échelle et valider son application aux communautés d'oomycètes pathogènes en milieu forestier, (ii) de décrire ces communautés microbiennes, en termes de diversité et de structure, à différentes échelles spatiales (locale, régionale et continentale), (iii) de caractériser les variables biotiques et abiotiques structurant ces communautés et (iv) d'évaluer la réponse éventuelle des communautés aux variations climatiques.

Une première étude pilote à l'échelle de la parcelle a été suivie de deux études à grande échelle spatiale le long de gradients environnementaux. Des gradients d'altitude et un gradient latitudinal, à l'échelle continentale, ont été utilisés comme gradient climatique.

L'étude préliminaire a donc validé l'utilisation du pyroséquençage pour les communautés fongiques, et en particulier pour les espèces ectomycorhiziennes, et apporté des éléments pour établir une méthodologie d'échantillonnage couplée à cette technique. L'application de ces outils moléculaires à l'étude des communautés oomycètes pathogènes reste à optimiser. Les résultats obtenus sur les communautés fongiques telluriques suggèrent que dans l'hypothèse d'un réchauffement climatique, la richesse fongique ne serait pas directement affectée mais la composition des communautés le serait. La composition des communautés fongiques est également fortement liée au pH du sol. Ces résultats sont à affiner en étudiant plus en détail divers groupes taxonomiques et écologiques en lien avec des variables climatiques plus précises. Par ailleurs, de nombreuses perspectives sont envisageables pour améliorer la détection des oomycètes dans les sols forestiers, qui reste un challenge en écologie microbienne.

**Mots clés:** champignons, oomycètes, mycorhizes, *Phytophthora*, *Fagus sylvatica*, gradient, température, pH, pyroséquençage