



Numéro d'ordre : 4511

## THESE

Présentée à

### L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

Ecole doctorale : Sciences et Environnements

Par

Tristan Cordier

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Spécialité : Ecologie évolutive, fonctionnelle et des communautés

# Structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et effet potentiel du changement climatique.

Soutenue publiquement le 6 avril 2012 devant le jury composé de :

M. Didier ALLARD	Professeur, Université Bordeaux 1	Président
M. Philippe VANDENKOORNHUYSE	Professeur, Université Rennes 1	Rapporteur
M. Roberto GEREMIA	Directeur de recherche, CNRS Grenoble	Rapporteur
Mme. Mélanie ROY	Maître de conférences, Université Paul Sabatier	Examineur
M. Jean-Luc DUPOUEY	Directeur de recherche, INRA Nancy	Examineur
Mme. Corinne VACHER	Chargé de recherche, INRA Bordeaux	Co-directeur de thèse

## *Remerciements*

Ce travail de thèse est le résultat de nombreuses collaborations et de rencontres, il est donc difficile de remercier tout le monde, mais je vais tacher de faire au mieux.

Je tiens d'abord à remercier Marie-Laure Desprez-Loustau, pour m'avoir encadré tout en me laissant une liberté quasi-totale. Son optimisme, son recul et nos nombreuses discussions m'ont permis de murir mes réflexions et de sans cesse améliorer mon travail. Mes remerciements vont ensuite à Corinne Vacher, pour son soutien sans faille tout au long de ces trois années. Nos interactions quasi quotidiennes m'ont énormément apporté, à tout point de vue. Je remercie également Cécile Robin, pour sa disponibilité et ses relectures toujours pertinentes et efficaces.

Merci à Aurore Coince, Emmanuel Defossez, Marc Buée, Benoit Marçais, Georges Kunstler pour nos collaborations dans le cadre du projet BACCARA.

Un grand merci à Xavier Capdevielle, pour son aide précieuse sur le terrain et nos discussions plus moins sérieuses à Pierrefite ou au pied des sites pyrénéens. Merci aussi à Olivier Fabreguettes, Martine Martin et Gilles Saint-Jean pour leur aide dans les laboratoires de mycologie et de biologie moléculaire.

Merci à Nicolas Feau, Benoit Barrès, Virgil Fievet et Cyril Dutech, pour les diverses discussions autour du coin café ou de la table de ping pong.

Merci enfin à mes amis et ma famille, pour leur soutien au cours de ces trois années.

<b>Préambule</b>	<b>1</b>
<b>I. Les champignons : un règne diversifié et méconnu</b>	<b>3</b>
1) Les phylums fongiques	3
2) Le concept d'espèce chez les champignons	4
3) Plus d'un million d'espèces	5
4) De nombreuses fonctions écologiques	6
<b>II. Outils pour l'étude des assemblages fongiques</b>	<b>8</b>
1) Méthodes culture-dépendantes	8
2) Méthodes culture-indépendantes	8
1. Le barcoding : définition et bref historique	8
2. Le barcode ADN et ses limites pour identifier les espèces	9
3. Barcoding chez les champignons	10
4. Biais quantitatifs et qualitatifs liés aux outils moléculaires	11
5. Les techniques d'empreintes moléculaires et le pyroséquençage	13
<b>III. La phyllosphère comme habitat microbien</b>	<b>15</b>
1) Définitions : phyllosphère, endophytes, épiphytes	15
2) La phyllosphère, un habitat soumis aux variations climatiques	16
3) La phyllosphère, un habitat colonisé au cours de la saison végétative	16
4) Diversité et variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère	17
5) Rôle écologique des champignons de la phyllosphère	18
<b>IV. Changement climatique et conséquences écologiques</b>	<b>20</b>
1) Définition et scénarios	20
2) Réponses possibles des espèces	23
<b>Objectifs de thèse et démarche</b>	<b>24</b>
<b>Chapitre 1 : Variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère : la distance génétique prédomine sur la distance géographique dans une forêt de hêtre (<i>Fagus sylvatica</i> L.)</b>	<b>25</b>
<b>Chapitre 2 : La composition des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre (<i>Fagus sylvatica</i> L.) varient le long d'un gradient d'altitude</b>	<b>27</b>
<b>Chapitre 3 : Distribution spatiale des principaux champignons pathogènes forestiers en France: recherche de contraintes climatiques, modélisation des effets d'un scénario de changement climatique</b>	<b>29</b>
Introduction	29

<b>Matériel et méthodes</b>	<b>32</b>
Données sur les espèces pathogènes	32
Données sur les espèces hôtes	33
Variables climatiques	39
Analyse des co-distributions altitudinales des espèces hôtes et pathogènes	41
Modélisation de niche des espèces et évolution des distributions sous un scénario de changement climatique	41
<b>Résultats</b>	<b>45</b>
Co-distributions hôtes-pathogène sur des gradients altitudinaux	45
Modélisations de niche	46
<b>Discussion</b>	<b>57</b>
Distribution des espèces et contraintes climatiques	57
Effets d'un scénario de changement climatique	60
<b>Discussion générale et perspectives</b>	<b>66</b>
<b>I. Méthode d'étude des assemblages fongiques de la phyllosphère</b>	<b>66</b>
1) Stratégie d'échantillonnage.	66
2) La CE-SSCP et le problème de l'alignement des profils	69
3) Le pyroséquençage 454 et ses limites	70
4) CE-SSCP ou pyroséquençage ?	73
5) Comment prendre en compte les espèces rares ?	73
6) Relier composition et fonction des assemblages fongiques	74
<b>II. Les facteurs structurant les assemblages fongiques de la phyllosphère.</b>	<b>76</b>
1) Les facteurs biotiques : génotype de l'hôte et traits fonctionnels foliaires	77
2) Les facteurs abiotiques : effet de la température dans les Pyrénées	78
3) Perspectives et autres valorisations des données	79
a) Tester l'importance relative du climat et de la variation génétique de l'hôte sur les assemblages fongiques	79
b) Tester l'hypothèse de la spécialisation d'échelle (SSH)	80
c) Vérifier l'effet de la température sur les assemblages fongiques le long de trois gradients d'altitude	83
d) Tester l'hypothèse d'un filtre par l'habitat dans les conditions de haute altitude	84
e) Diversité et structure des assemblages de Péronosporales de la rhizosphère du hêtre le long de gradients d'altitude	86
<b>III. Effets potentiels du changement climatique</b>	<b>87</b>
1) Quelles approches ?	87
2) Le réchauffement, oui mais...	89
<b>Bibliographie</b>	<b>91</b>

## Préambule

Cette thèse s'est déroulée en trois ans et trois mois dans l'équipe de génétique et écologie des maladies forestières (Gemfor) de l'UMR Biodiversité, Gènes et Communautés (BIOGECO), sur le site de l'INRA Pierroton, grâce à un co-financement du projet européen BACCARA (Biodiversity and climate change, a risk analysis) et du Ministère de l'Agriculture. Elle s'inscrit dans un cadre d'écologie des communautés microbiennes. L'objectif principal était d'étudier les effets potentiels du changement climatique sur les assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et sur la distribution des champignons pathogènes forestiers en France.

Le niveau d'intégration biologique « assemblages fongiques » n'était pas encore abordé lorsque je suis arrivé dans l'équipe en décembre 2008. J'ai d'abord mis au point les protocoles d'extraction d'ADN à partir de feuilles de hêtre et optimisé la CE-SSCP pour pouvoir décrire les assemblages fongiques de la phyllosphère. En 2009, nous avons déposé et obtenu un projet au Génomoscope pour réaliser du pyroséquençage 454. Ce projet a pu couvrir l'ensemble des besoins en séquençage requis par cette thèse. Dans le cadre d'un cours organisé notamment par Henrik Nilsson à l'Université de Tartu en Estonie (24 au 26 mai 2010), j'ai acquis des compétences en bioinformatique pour pouvoir traiter et analyser les données issues de pyroséquençage. J'ai transmis mes compétences aux membres de l'équipe et elles sont actuellement utilisées dans le cadre d'une thèse sur la génétique des communautés fongiques (thèse de Boris Jakuschkin, 2011-2014).

Le hêtre a été choisi comme modèle d'étude dans le cadre du projet européen BACCARA. Après une première étude sur la variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre publiée dans *Fungal Ecology* (chapitre 1 du manuscrit), nous avons échantillonné des feuilles de hêtres le long d'un gradient altitudinal dans les Pyrénées pendant deux années consécutives pour étudier l'effet du climat sur la composition des assemblages fongiques. Cette étude est actuellement en révision pour *New Phytologist* (chapitre 2 du manuscrit). Dans le cadre du projet BACCARA, nous avons collaboré avec Aurore Coince, Marc Buée et Benoit Marçais de l'UMR Interactions Arbre-Microorganismes (UMR IaM, INRA Nancy) ainsi qu'avec Georges Kunstler et Emmanuel Defosse (IRSTEA Grenoble) pour étudier deux autres gradients altitudinaux (Vosges et Alpes). A partir des échantillons qui ont été collectés le long des gradients, j'ai réalisé l'étude concernant la phyllosphère (les équipes de Nancy et Grenoble s'intéressant aux espèces fongiques

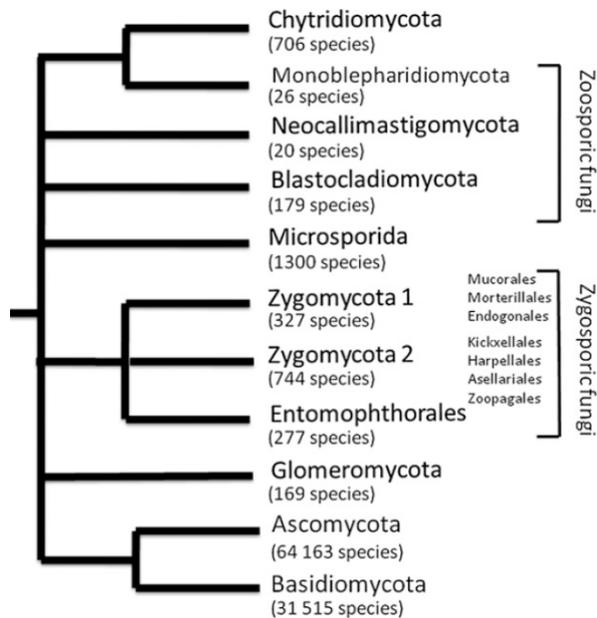
telluriques, champignons mycorhiziens et *Phytophthora*). Les données de séquençage ont été obtenues et en partie traitées, certains résultats préliminaires figurent dans la partie discussion de ce manuscrit. Cette étude fera l'objet d'une publication commune prochainement, dans laquelle nous présenterons conjointement les variations altitudinales des assemblages fongiques de la phyllosphère et des assemblages fongiques telluriques associés au hêtre. Par ailleurs, une collaboration avec Patrice Rey et Jessica Vallance de l'UMR Santé et Agroécologie du Vignoble (UMR SAVE, INRA Bordeaux) nous a permis d'étudier les variations de composition des assemblages bactériens de la phyllosphère le long du gradient pyrénéen. Cette étude fera également l'objet d'une publication commune, dans laquelle nous comparerons les patrons de diversité bactéries/champignons. Des résultats préliminaires sont également présentés dans la partie discussion de ce manuscrit.

Après avoir étudié l'influence du climat sur les assemblages fongiques grâce à des gradients altitudinaux, nous nous sommes donné pour objectif d'étudier les effets potentiels du changement climatique sur la distribution des champignons pathogènes forestiers en France. Sur ce volet, nous avons collaboré avec Dominique Piou, ingénieur du DSF détaché à l'INRA Bordeaux. Nous avons utilisé la base de données du DSF afin de construire des modèles de niche sur la période actuelle pour les 29 espèces les plus dommageables, responsables d'environ 70% de l'ensemble des mentions de maladie dans la base du DSF. Nous avons ensuite utilisé ces modèles afin de prédire la distribution de ces pathogènes à la fin du siècle sous un scénario de changement climatique retenu par le GIEC (Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat). Le chapitre 3 de ce manuscrit présente les analyses effectuées et les résultats obtenus jusqu'à présent ainsi que les perspectives pour terminer cette étude en vue d'un article.

# I. Les champignons : un règne diversifié et méconnu

## 1) Les phylums fongiques

Les champignons sont un règne du vivant regroupant 99000 espèces en une dizaine de phylums, et dont la classification est régulièrement revue (James *et al.* 2006 ; Hibbet *et al.* 2007 ; McLaughlin *et al.* 2009, Blackwell, 2011). Parmi les phylums les plus importants, on retrouve les Chytridiomycota, les Zygomycota, les Gloméromycota, les Basidiomycota et les Ascomycota. Ces deux derniers phylums (classés dans le sous règne des Dikarya) regroupent la grande majorité des espèces décrites à ce jour (Figure 1).



**Figure 1 : Phylums fongiques et nombre d'espèces décrites (Classification extraite de Blackwell, 2011 et nombre d'espèces de, Kirk et al. 2008)**

Les Chytridiomycota regroupent les espèces produisant des spores uniflagellées (zoospores), témoignant d'une vie majoritairement aquatique, et constituent la lignée évolutive la plus ancienne des champignons (James *et al.* 2006). Le groupe des Zygomycota est plus récent, il regroupe de nombreux saprotrophes et parasites d'insectes. Les Gloméromycota regroupent des champignons symbiotiques et biotrophes stricts de plantes, qui forment des mycorhizes à arbuscules. Les Ascomycota regroupent les champignons à lichens, de nombreux pathogènes des plantes, des levures utiles pour l'homme (*Saccharomyces cerevisiae*). Les Basidiomycota regroupent la majorité des champignons mycorhiziens à carpophores, mais aussi des parasites des plantes et des levures. Les phylogénies moléculaires des champignons sont régulièrement remises en question suite à la

découverte de nouvelles espèces, l'intégration de séquences environnementales et les avancées dans les méthodes de reconstruction phylogénétique. Ainsi, les Cryptomycota ont récemment été ajoutés à la classification (Jones *et al.* 2011).

## 2) Le concept d'espèce chez les champignons

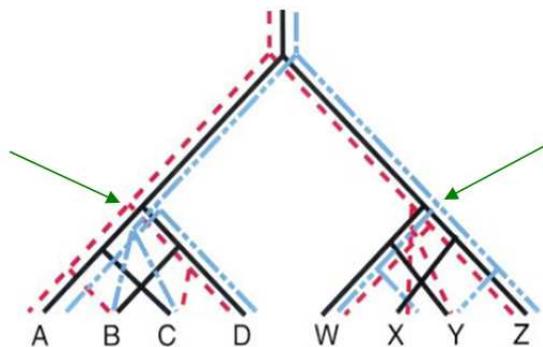
L'étude d'une communauté nécessite l'identification des individus qui la composent. L'identification repose sur une classification des individus en groupes partageant des caractéristiques communes. Ces critères peuvent être morphologiques, biologiques et génétiques, et servent à définir l'unité d'étude dans les études d'écologie des communautés : l'espèce. Même si l'espèce constitue l'unité la plus importante en biologie, la définition du terme est encore soumise à controverse (Hausdorf, 2011). Un seul concept ou une seule définition de l'espèce n'est pas applicable à tous les domaines du vivant.

Le concept d'espèce phénétique (ou morphologique) a été le seul moyen de classer les espèces avant l'usage des outils moléculaires. Une espèce morphologique est définie sur des critères phénotypiques et se différencie d'une autre sur la base de ces mêmes critères. Ces critères peuvent aboutir à des classifications ne reflétant pas forcément les relations évolutives (phylogénétiques), et selon les critères sélectionnés, les relations ou frontières entre espèces peuvent bouger. De plus, la plasticité phénotypique d'un caractère, le stade de vie ou encore le sexe biologique du spécimen au moment de son observation peut conduire à une classification incorrecte. La classification des individus sur la base de critères morphologiques demande donc souvent un haut niveau d'expertise. Chez les champignons, les critères morphologiques utilisés sont la plupart du temps l'organisation et la morphologie des organes de reproduction (sexués et/ou asexués), la pigmentation du mycélium, la production de métabolites secondaires, le type de reproduction sexuée (homothallique ou hétérothallique), les vitesses et extrêmes de croissance, ou les compatibilités sexuelles et végétatives (Taylor *et al.* 2000). Les champignons font preuve d'une grande plasticité phénotypique en fonction de l'environnement (composition du milieu de culture, température, humidité), rendant la classification sur la base de ces seuls critères complexe.

Le concept d'espèce biologique (sensu Mayr, 1940), c'est-à-dire l'inter-fécondité des individus, la viabilité et la fertilité de la progéniture, fonctionne pour les organismes à reproduction sexuée, mais devient difficile à appliquer pour les organismes pouvant se reproduire de manière asexuée, ce qui est le cas des insectes à parthénogenèse, la plupart des champignons, certaines plantes ou encore les bactéries (Rossello-Mora & Amann, 2001). Le

concept d'espèce biologique ne pouvant pas s'appliquer de manière universelle, il a été proposé d'adopter en plus le concept d'espèce phylogénétique, qui tient compte des flux de gènes, quelqu'en soit le mode. Ces flux de gènes peuvent être verticaux, dans le cas de reproduction sexuée, et horizontaux, dans le cas de reproduction asexuée ou dans le cas de transfert horizontal de gènes entre lignées. Ce transfert de gènes entre lignées est fréquent chez les bactéries (Ochman *et al.* 2000), chez les champignons (Xie *et al.* 2008, Richards, 2011) et il semble même possible entre bactéries et champignons (Fitzpatrick *et al.* 2008).

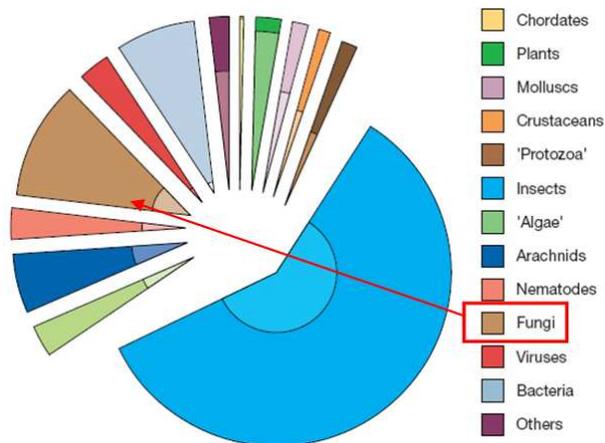
Le concept d'espèce phylogénétique est défini chez les eucaryotes (sensu Cracraft, 1983, cité par Taylor *et al.* 2000) comme étant le plus petit agrégat identifiable de populations ou de lignées partageant une combinaison unique de caractères (gènes) et partageant un même ancêtre commun, c'est-à-dire un cluster monophylétique (Figure 2). Ce concept d'espèce est aujourd'hui le plus utilisé chez les champignons, puisque il a permis de mettre à jour de nombreux complexes d'espèces cryptiques, c'est à dire morphologiquement identiques (Giraud *et al.* 2008 ; Mougou *et al.* 2008).



**Figure 2 : Illustration du concept d'espèce phylogénétique avec une phylogénie à trois gènes (adapté de Taylor *et al.* 2000). La transition entre congruence parmi les branches à l'incongruence (flèche vertes) permet de diagnostiquer le « cloisonnement » des échanges de gène et donc deux espèces phylogénétiques distinctes.**

### 3) Plus d'un million d'espèces

Parmi tous les organismes vivants, on estime que les champignons représentent le deuxième règne le plus riche en espèces de la biosphère, les insectes étant de loin le règne le plus riche (figure 3).



**Figure 3 : Estimation de la répartition des espèces dans les règnes du vivant (Purvis & Hector, 2000). En plus clair au centre est représentée la proportion d'espèces décrites dans le règne.**

La première estimation du nombre total minimum d'espèces de champignons (Straménopiles compris) basée sur les ratios plantes/champignons connus dans différentes régions du globe fut réalisée par Hawksworth en 1991. Approximativement 69 000 espèces étaient décrites et il estimait à 1 500 000 le nombre minimal d'espèces de champignons existantes. Cette estimation est minimale car elle dépend du ratio du nombre d'espèces de champignons connues par espèce de plante par région (6/1). Or le nombre exact d'espèces de champignons associés à une espèce de plante n'est pas connu et certainement sous-estimé. Toutefois, aujourd'hui encore, ce chiffre est généralement admis comme base raisonnable (Hawksworth, 2001 ; Seifert, 2009), même si plus récemment ce chiffre a pu être revu considérablement à la hausse. Les dernières estimations, réalisées avec des estimations de diversité fongique issues des approches de métagénomique environnementale, varient entre 3.5 à 5.1 millions d'espèces (O'Brien *et al.* 2005 ; Blackwell, 2011 ; Bass & Richards, 2011).

#### **4) De nombreuses fonctions écologiques**

Les champignons sont une composante essentielle du fonctionnement des écosystèmes. Ils sont hétérotrophes, c'est-à-dire que leur source de composés hydrocarbonés est exogène, contrairement aux plantes et certaines bactéries photosynthétiques. En tant que saprophytes, ils permettent le recyclage, par des voies métaboliques complexes, de la matière organique végétale et animale en éléments minéraux disponibles pour les plantes (van der Heijden *et al.* 2008). En tant que mutualistes de végétaux, ils facilitent la nutrition hydrique et minérale et augmentent ainsi la productivité primaire (Courty *et al.* 2010). Enfin en tant que

parasites, ils causent des mortalités et peuvent structurer ainsi directement les communautés végétales et animales (Gilbert *et al.* 2002 ; Newton *et al.* 2010) et indirectement les organismes dépendant de ces hôtes par cascade trophique (Morris & Robertson, 2005). Aujourd'hui, très peu de connaissances sont disponibles sur les tailles et les composantes des assemblages responsables de chaque fonction (Morris & Robertson, 2005). En effet, le mode de nutrition n'est pas phylogénétiquement conservé et a évolué de manière indépendante dans les lignées fongiques (James *et al.* 2006, Figure 4).

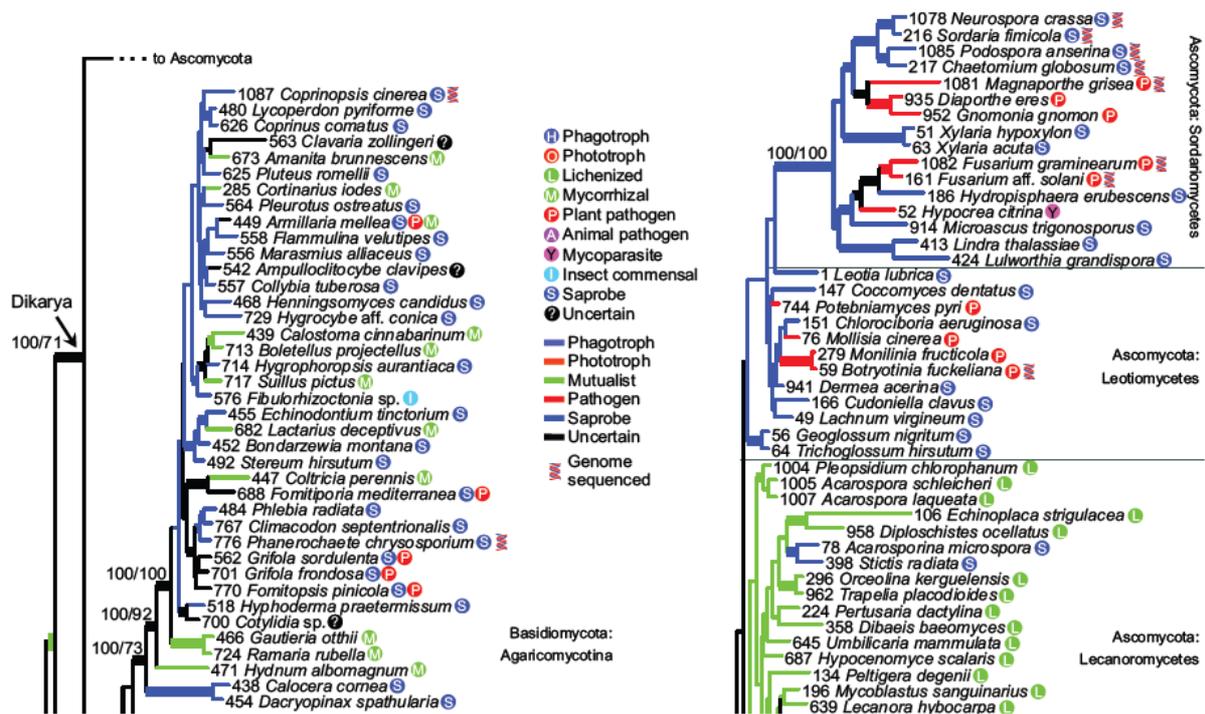


Figure 4: Extrait de l'arbre phylogénétique présenté dans James *et al.* (2006), illustrant l'absence de conservatisme phylogénétique du mode de nutrition chez les champignons.

Historiquement, l'étude des champignons se faisait par culture en milieu artificiel. Depuis quelques décennies et l'avènement des méthodes moléculaires, l'étude des champignons a connu un nouvel essor (Peay *et al.* 2008).

## II. Outils pour l'étude des assemblages fongiques

### 1) Méthodes culture-dépendantes

La majorité des études consacrées aux champignons associés aux plantes ont été réalisées par isolement sur milieu de culture. L'avantage majeur d'obtenir des cultures pures de champignon, en plus de pouvoir formellement décrire des traits phénotypiques, est de pouvoir directement étudier l'effet de traitements expérimentaux, d'inoculer une plante, ou encore d'accéder à l'ensemble du génome pour étudier des gènes spécifiques. Bien que ces approches aient permis de décrire de nombreuses espèces et d'étudier de nombreux pathosystèmes, elles ne sont pas applicables pour une grande majorité des champignons. En effet, il est en général impossible de recréer artificiellement les conditions dans lesquelles les champignons se développent (cas des biotrophes par exemple). Pour les études de la diversité fongique dans la phyllosphère ou rhizosphère, les méthodes culture-dépendantes sous-estiment donc la richesse spécifique. D'autres limites existent, comme par exemple des vitesses de croissance variables entre espèces et la compétition pour l'accès aux ressources. Ainsi, certaines espèces présentes en faible biomasse dans un échantillon peuvent être prédominantes en culture et inversement. Ce cas de figure a été montré sur *Pinus taeda*, où de nombreux isolats de Sordariomycètes ont été obtenus alors que l'utilisation d'outils moléculaires n'a pas permis de détecter ces champignons (Arnold *et al.* 2007). En conséquence, même si d'importants progrès ont été faits en matière de culture (Unterseher & Schnittler, 2009), la détection de nombreuses espèces ne peut se faire que par l'utilisation des méthodes moléculaires.

### 2) Méthodes culture-indépendantes

#### 1. Le barcoding : définition et bref historique

Le barcoding désigne l'usage d'un marqueur génétique standard court pour identifier un organisme au niveau spécifique. L'idée est de développer un moyen simple, rapide et utilisable par des non experts, d'identifier une espèce. Le terme « barcode ADN » a été pour

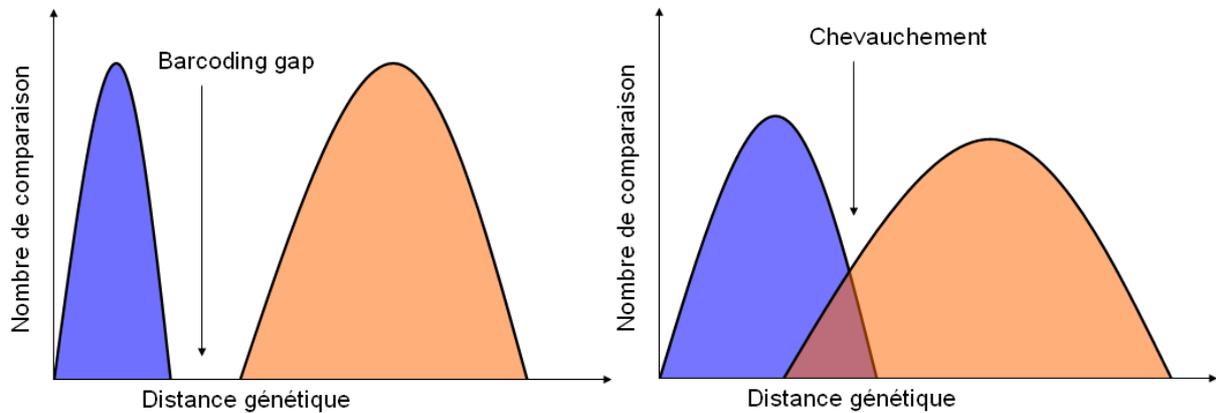
la première fois employé dans une étude sur *Plasmodium falciparum* (l'agent responsable de la malaria). Il désignait l'usage d'un gène hyper-variable comme outil pour identifier les différentes lignées d'une espèce et mener ainsi des études de génétique des populations et d'épidémiologie (Arnot *et al.* 1993). Le terme a été repris en 2003 dans un article proposant le gène de la cytochrome oxydase 1 (COX1) comme barcode pour les animaux supérieurs (Hebert *et al.* 2003). La même année, le consortium international Barcode of Life (CBOL) et le projet international Barcode of Life (iBOL) ont réuni des équipes de recherche du monde entier et d'importants moyens financiers ont été déployés pour organiser la constitution de bases de données de séquences et de spécimens de référence.

## 2. Le barcode ADN et ses limites pour identifier les espèces

L'identification d'une espèce par barcode ADN permet de s'affranchir des limites liées à la morphologie et de délimiter les espèces d'un complexe d'espèces cryptiques (Hebert *et al.* 2003 ; Witt *et al.* 2006 ; Valentini *et al.* 2008). De plus, l'inventaire des espèces par ce moyen est beaucoup plus rapide et ne requiert pas de spécialisation pour l'identification des différents groupes taxonomiques. Un barcode idéal est un gène orthologue (présent chez toutes les espèces), court (moins de 1000 pb), facilement amplifiable par PCR (Polymerase Chain Reaction) et ayant surtout un niveau de variabilité interspécifique minimal supérieur au niveau maximal de variabilité intraspécifique.

L'usage strict du barcode ADN n'en reste pas moins une approche avec des limites. D'abord, l'usage d'un seul marqueur peut conduire à des erreurs, puisqu'il est possible que des espèces différentes possèdent exactement la même séquence pour ce marqueur par des transferts interspécifiques de gènes ou par une spéciation inachevée (Valentini *et al.* 2008). Ensuite, la variabilité intraspécifique du marqueur par rapport à sa variabilité interspécifique est loin d'être à un niveau fixe. Ce seuil de délimitation (ou « barcoding gap ») est en effet bien plus souvent un chevauchement qu'une vraie séparation (figure 5), ce qui pose problème pour établir un seuil de similarité de séquence comme délimitation spécifique. L'approche par seuil peut donc générer de faux positifs et négatifs, c'est-à-dire une assignation erronée à une espèce connue ou non (Meyer & Paulay, 2005 ; Wiemers & Fiedler, 2007). Ces deux études montrent que le problème se pose surtout dans les clades insuffisamment échantillonnés en nombre d'individus et en provenance géographique par espèce, car les variabilités intraspécifiques du barcode sont alors souvent sous estimées.

Ainsi, le débat est encore animé et plusieurs études ont souligné l'importance d'établir un diagnostic sur un faisceau d'informations plutôt que sur l'une ou l'autre approche uniquement (Will & Rubinoff, 2004 ; Will *et al.* 2005 ; Wiemers & Fiedler, 2007).



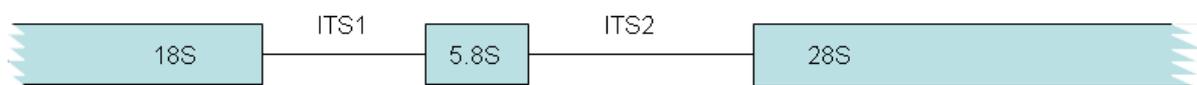
**Figure 5 : Illustration du barcoding gap et du chevauchement. En bleu sont les comparaisons intraspécifiques de séquences du marqueur utilisé et en orange les comparaisons interspécifiques.**

Enfin, la constitution de bases de données de séquences fiables repose sur l'expertise de taxonomistes en collaboration avec des moléculaires, et sur une couverture taxonomique suffisante des espèces par clade. Les bases de données internationales comme GenBank (NCBI) ou EMBL (l'équivalent Européen) contiennent des accès insuffisamment voire mal identifiés (Bridge *et al.* 2003 ; Nilsson *et al.* 2006). Afin de palier ces problèmes, une initiative comme UNITE (Kõljalg *et al.* 2005), qui associe taxonomistes (mycologues), moléculaires et bioinformaticiens pour construire une base de donnée « corrigée », semble la plus adaptée pour l'usage du barcode ADN (Begerow *et al.* 2010).

### 3. Barcoding chez les champignons

Le barcoding pour les champignons était déjà utilisé sans que le terme ne soit spécifiquement utilisé (Seifert *et al.* 2009), notamment avec les travaux sur l'ITS (internal transcribed spacer, Figure 6) dans les années 1990 (White *et al.* 1990 ; Gardes et Bruns, 1993). Etant le marqueur historique pour ces organismes, il est le plus représenté dans les bases de données comme GenBank. Le barcode COX1, proposé par le CBOL, n'est pas

suffisamment résolutif pour les champignons et est trop variable en taille pour représenter une alternative crédible (Seifert, 2009). Ainsi, l'ITS s'est rapidement imposé pour les champignons (Nilsson *et al.* 2006 ; 2009 ; Seifert, 2009) même si son utilisation comporte plusieurs limites. Parmi les limites, on peut citer une faible résolution pour certains taxons. Il existe certains genres (*Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*) pour lesquels l'ITS n'est pas assez variable pour permettre une identification spécifique (Seifert, 2009), et d'autres pour lesquels il est trop variable pour séparer les espèces proches, ce qui est le cas des endomycorhizes à arbuscules, les Glomeromycètes (Stockinger *et al.* 2010).



**Figure 6 : Schéma de l'opéron ribosomal de l'ADN nucléaire des champignons. Le 18S, le 5.8S et le 28S sont des zones très conservées, alors que l'ITS1 et l'ITS2 sont très variables d'une espèce à l'autre, ce qui en fait une cible de choix pour le barcoding.**

Sur la base des données existantes et disponibles dans GenBank en 2008 (4185 espèces dans 973 genres), le niveau de variabilité intraspécifique moyen de l'ITS chez les espèces fongiques était de 2.5%, avec entre 2% pour les ascomycètes et 3.3% chez les basidiomycètes (Nilsson *et al.* 2008). Ces estimations se basent sur un échantillonnage très réduit d'espèces connues par rapport à la diversité potentielle des champignons (0.28 % des 1500000 espèces potentielles). Comme beaucoup d'espèces sont encore inconnues, des approximations d'espèces sont généralement définies, sur la base de similarité de l'ITS. Un seuil de 3% est globalement admis pour définir ces proxy d'espèces, ou MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Unit).

#### 4. Biais quantitatifs et qualitatifs liés aux outils moléculaires

Les techniques moléculaires comportent plusieurs biais, d'ordre qualitatif (inventaire incomplet des espèces) et/ou quantitatif (évaluation incorrecte de leur abondance relative) (Kanagawa, 2003). Tout d'abord, le rendement d'extraction ADN n'est probablement pas le même pour tous les organismes, générant les deux types de biais. De la même manière, le rendement de la PCR n'est probablement pas le même pour tous les organismes. En effet, des

biais peuvent être générés en fonction du pourcentage en GC car celui-ci va influencer la séparation des deux brins d'ADN, les liaisons GC demandant plus d'énergie pour être rompues (trois liaisons hydrogènes contre deux avec la liaison AT). Le nombre variable de copies du locus utilisé comme barcode dans le génome va entraîner, en théorie, uniquement des biais quantitatifs. En effet, il a été montré que le nombre de copies de l'opéron ribosomal (en tandem dans le génome) est variable selon les espèces, et même parmi les isolats d'une même espèce, pouvant passer du simple au triple chez une même espèce (Rustchenko, 1993 ; Howlett *et al.* 1997 ; Herrera *et al.* 2009). Ce nombre de copies semble être influencé par les conditions environnementales chez *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Rutchinko, 1993), alors que ce chiffre est stable pour *Aspergillus fumigatus* soumis à différents traitements environnementaux (Herrera *et al.* 2009). Enfin, la formation de chimères, c'est-à-dire la liaison par erreur de deux fragments issus d'ADN matrice différent, est un phénomène courant lors des PCR environnementales qui peut générer des biais qualitatifs. Les chimères sont formées surtout en fin de PCR, lorsque la concentration en amplicon est forte, et peuvent être favorisées par une température d'annealing trop faible. Deux brins d'ADN de deux espèces ayant une partie de la séquence homologue peuvent se « coller » durant la phase de polymérisation, la taq polymérase peut alors passer d'un brin à l'autre et générer un amplicon avec une partie de l'espèce A et l'autre partie de l'espèce B. Lors d'amplification de l'ITS complet, la zone conservée du 5.8S se prête particulièrement à ce type de biais.

S'il est difficile de réduire la plupart des biais mentionnés précédemment, il est possible de bien choisir les amorces utilisées pour amplifier le barcode, afin de ne pas aggraver les biais sur les inventaires taxonomiques et les estimations d'abondance. Si les sites d'hybridation sont mal choisis, on peut ne pas amplifier des clades entiers, ou obtenir des séquences d'organismes non désirés. La difficulté est donc de trouver deux zones suffisamment conservées chez les organismes cibles mais suffisamment divergentes chez les autres organismes, flanquant une zone suffisamment informative pour constituer un barcode. Les sites d'hybridation des amorces (Figure 7) permettent de calculer approximativement la taille des amplicons générés par PCR. Cela a son importance dans le traitement des produits PCR, soit par analyse de fragment par SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) soit par pyroséquençage. En effet, les fragments de petite taille, c'est-à-dire inférieurs à 300 paires de bases sont plus adaptés pour une bonne résolution de la SSCP (Sheffield *et al.* 1993, cité par Zinger *et al.* 2007). Pour le pyroséquençage, les nouvelles technologies permettent de séquencer des fragments de 500 paires de bases au maximum (Kircher & Kelso, 2010). Ainsi,

les amorces ciblant l'ITS1 (Internal Transcribed Spacer) sont souvent privilégiées dans les études récentes (Buée *et al.* 2009 ; Jumpponen & Jones, 2009). L'ITS1 présente également l'avantage d'être généralement plus polymorphe que l'ITS2 (Nilsson *et al.* 2008), donc plus résolutif pour identifier les espèces. Par contre, il semble que le couple ITS1F / ITS2 pour amplifier l'ITS1 puisse avoir des préférences d'amplification et générer des inventaires taxonomiques légèrement biaisés vers les basidiomycètes (Bellemain *et al.* 2010).



Figure 7 : Sites d'hybridation de quelques amorces.

## 5. Les techniques d'empreintes moléculaires et le pyroséquençage

Après avoir amplifié le barcode ADN par PCR, il est possible de caractériser les communautés microbiennes soit avec des techniques d'empreintes moléculaires, soit par clonage-séquençage ou pyroséquençage. Compte tenu du fait qu'une large majorité des microorganismes ne sont pas cultivables, ces technologies ont permis de réinventer la discipline de l'écologie microbienne, en donnant la possibilité d'étudier ces communautés *in situ*.

Les techniques d'empreintes moléculaires, dont fait partie la CE-SSCP (Capillary Electrophoresis Single Strand Conformation Polymorphism), permettent de séparer les amplicons selon leur polymorphisme de taille et de séquence, pour générer des « profils » reflétant la richesse (nombre de pics dans le profil) et la composition d'une communauté microbienne (position des pics sur l'axe de migration et hauteur des pics). Cette technique permet d'avoir des approches haut-débit en termes de nombre d'échantillons (Zinger *et al.* 2008) et elle est moins onéreuse que le pyroséquençage. L'inconvénient est qu'elle ne donne pas accès aux séquences, et que des problèmes de co-migration de phylotypes différents peuvent arriver.

Le pyroséquençage 454 permet d'obtenir environ un million de lectures de 500 paires de bases par plaque de séquençage sans passer par une étape de clonage (Shendure & Ji, 2008 ; Kircher & Kelso, 2010). Le pyroséquençage est quantitatif, c'est-à-dire qu'une copie de

séquence présente en forte proportion dans le pool d'amplicons ressortira en autant de copies dans le jeu de séquences (mais voir Amend *et al.* 2010 ; Berry *et al.* 2011).

Le pyroséquençage offre une couverture bien plus complète de la communauté microbienne que la CE-SSCP et il donne la possibilité d'identifier taxonomiquement les MOTUs, même si les insuffisances et erreurs d'annotation de séquences dans les bases de données (GenBank) sont régulièrement soulevées comme limite (Bridge *et al.* 2003 ; Nilsson *et al.* 2006). Même si les biais moléculaires durant la PCR sont les mêmes quelle que soit la méthode pour caractériser la communauté microbienne (mais voir Berry *et al.* 2011 dans le cas du pyroséquençage), le pyroséquençage est donc bien plus prometteur que la CE-SSCP pour les études d'écologie microbienne. L'avantage est qu'il donne justement accès aux séquences, pour faire des identifications d'espèces, ou pour accéder à la composition phylogénétique d'une communauté et tester des hypothèses sur les facteurs écologiques impliqués dans l'assemblage de cette communauté (Webb *et al.* 2002, Cavender-Bares *et al.* 2009 ; Morlon *et al.* 2011). Il existe donc une variété de techniques permettant d'étudier les assemblages fongiques, avec chacune ses avantages et ses inconvénients. Le choix de la technique dépend de la question posée et du budget.

### III. La phyllosphère comme habitat microbien

#### 1) Définitions : phyllosphère, endophytes, épiphytes

Il existe deux définitions de la phyllosphère dans la littérature, l'une désigne l'habitat fourni par l'ensemble des parties aériennes des plantes (Lindow & Brandl, 2003) et l'autre désigne seulement la partie foliaire des plantes (Jumpponen & Jones, 2009). Ces feuilles et autres parties aériennes abritent de nombreuses espèces bactériennes et fongiques sous forme de levures, de champignons filamenteux ou encore de spores en dormance (Lindow & Brandl, 2003, Figure 8). Dans le présent manuscrit, la phyllosphère fait référence à la partie foliaire des plantes. La surface foliaire totale sur le globe est estimée à  $4 \times 10^8 \text{ km}^2$  (Morris & Kinkel, 2002), soit plus que deux fois la surface couverte par les continents.

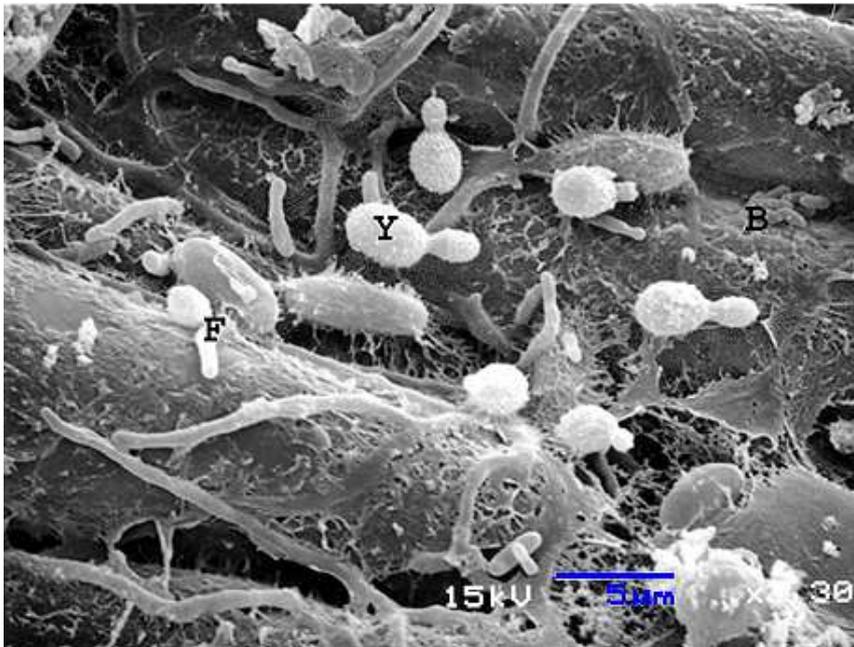
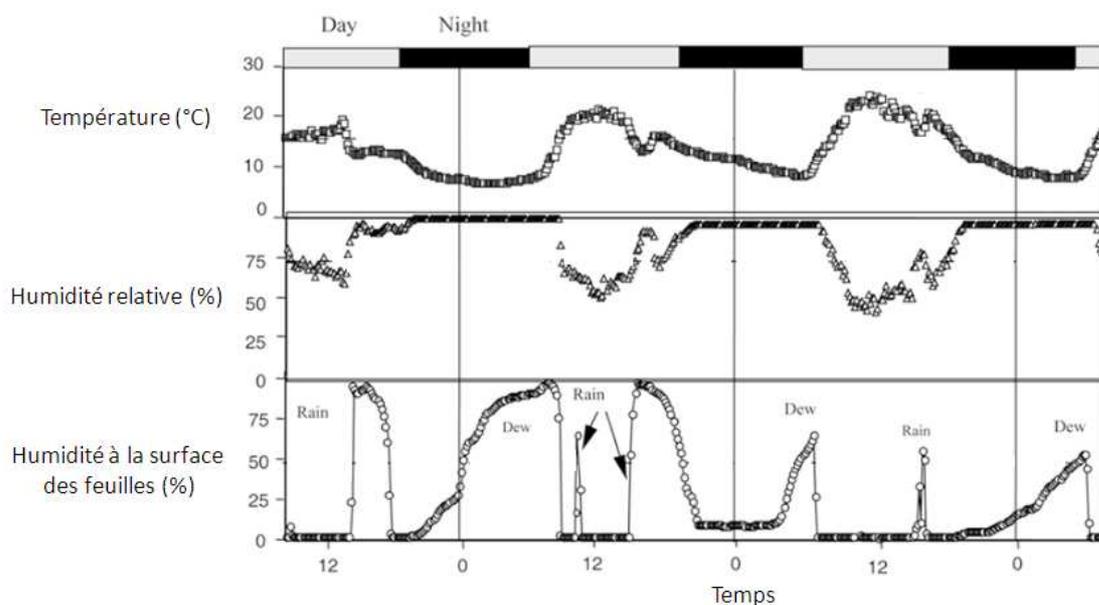


Figure 8 : Photo au microscope électronique de la surface d'un fruit avec des bactéries (B), des levures (Y), et des champignons filamenteux (F). Issu de Buck *et al.* 2003.

Ces organismes peuvent être soit épiphytes en vivant sur la surface des feuilles (Inacio *et al.* 2002), soit endophytes vivant à l'intérieur des tissus, dans les espaces inter-cellulaires des feuilles (Arnold *et al.* 2000 ; Rodriguez *et al.* 2009). La distinction entre le statut d'endophyte et d'épiphyte n'est pas évidente. En effet, certaines espèces microbiennes peuvent activement pénétrer les tissus de la feuille pour devenir endophytes (Viret *et al.* 1994 ; Wilson *et al.* 1999).

## 2) La phyllosphère, un habitat soumis aux variations climatiques

La phyllosphère est soumise à de fortes variations microclimatiques, en température, humidité relative de l'air, mais aussi en termes d'alternance d'eau liquide à la surface et dessiccation. Même si d'autres environnements microbiens peuvent être plus extrêmes pour ces conditions, la particularité de la phyllosphère est la rapidité de ces changements (figure 9).



**Figure 9 : Variations de température, d'humidité relative de l'air et au niveau de la surface de feuilles de poirier au cours de trois journées au mois de mai (d'après Montesinos *et al.* 2002). Les épisodes de pluie et de rosée sont indiqués sur le graphe du bas.**

Les conditions climatiques à la surface des feuilles variant rapidement en fonction des cycles jour/nuit et des épisodes de pluie, on peut s'attendre à ce que le changement climatique ait un effet sur les communautés microbiennes de la phyllosphère.

## 3) La phyllosphère, un habitat colonisé au cours de la saison végétative

Au cours d'une saison végétative, la biomasse microbienne de la phyllosphère a tendance à augmenter (Thompson *et al.* 1993 ; Inácio *et al.* 2002). On observe généralement une succession des populations microbiennes, avec une majorité de bactéries après débournement, ensuite une majorité de levures, et enfin une majorité de champignons filamenteux en fin de saison (Kinkel, 1997). Des variations saisonnières d'abondance des

espèces fongiques, plus que des variations de type présence/absence, ont été montrées pour la majorité des endophytes et épiphytes dominants les assemblages, alors que quelques espèces dominantes sont constantes (Sahashi *et al.* 1999 ; Osono & Morri, 2005 ; Göre & Bucak, 2007 ; Guo *et al.* 2008). Ce même patron a également été montré avec du pyroséquençage, avec plus d'un tiers des espèces dynamiques dans la saison et les deux autres tiers constants dans la saison (Jumpponen & Jones, 2010).

Les sources de microorganismes colonisant la phyllosphère sont multiples. Les épiphytes peuvent coloniser la surface foliaire via l'atmosphère (Talley *et al.* 2002 ; Levetin *et al.* 2006), les insectes (Coluccio *et al.* 2008, Feldman *et al.* 2008), les projections par la pluie (Wilson & Carroll, 1994) ou encore par les oiseaux. L'inoculum ambiant peut varier qualitativement et quantitativement en fonction du cycle de vie des champignons, en réponse à l'environnement comme la pluie, aux températures extrêmes ou au vent (Kinkel, 1997 ; Talley *et al.* 2002). Il a aussi été montré que des bactéries du sol peuvent coloniser l'intérieur des racines et devenir endophytes dans les feuilles via le système vasculaire de la plante (Lamb *et al.* 1996 ; Wulff *et al.* 2003). A ma connaissance, ce mode de colonisation n'a pas été montré chez les champignons.

#### **4) Diversité et variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère**

La phyllosphère des arbres forestiers abrite de très nombreuses espèces fongiques, avec presque 350 espèces différentes isolées à partir de 83 feuilles de *Heisteria concinna* ou de *Ouratea lucens* (Arnold *et al.* 2000) ou encore jusqu'à 700 espèces moléculaires (ou MOTUs, pour Molecular Operational Taxonomic Unit) sur un seul arbre (Jumpponen & Jones, 2009). Ce compartiment microbien pourrait abriter une proportion importante de champignons inconnus (Blackwell, 2011 ; Porras & Bayman, 2011). Ces assemblages fongiques sont dominés par quelques taxons seulement, que ce soit pour les endophytes (Sahashi *et al.* 1999 ; Arnold *et al.* 2007 ; Hashizume *et al.* 2008), ou pour les épiphytes (Inácio *et al.* 2002 ; Inácio *et al.* 2010). Ceci est également vrai dans les études récentes utilisant des méthodes moléculaires, donc sans distinction entre épiphytes et endophytes (Jumpponen & Jones, 2009 ; Jumpponen & Jones, 2010 ; Unterseher *et al.* 2011).

La variabilité spatiale des champignons de la phyllosphère a surtout été étudiée avec des méthodes nécessitant la mise en culture des champignons, la plupart concernant les endophytes. L'espèce hôte semble être le premier facteur structurant, à la fois en milieu tempéré (Petrini & Fisher 1988, 1990; Hoffman & Arnold, 2008, Joshee *et al.* 2009), et en milieu tropical (Arnold *et al.* 2001). On observe des variations d'abondance, plus qu'en terme de présence/absence, à l'échelle régionale (Arnold *et al.* 2001; Vujanovic & Brisson, 2002; Joshee *et al.* 2009). Au sein d'une même canopée, il peut aussi y avoir des disparités, entre le haut, directement exposé au rayonnement solaire et aux vents, et le bas, plus humide et ombragé (Unterseher *et al.* 2007), en fonction de la position de la feuille dans la canopée (Osono, 2004) et entre branches d'un même arbre (Joshee *et al.* 2009). Il existe des variations spatiales marginales au sein d'une même feuille de hêtre (Sieber & Hugentobler, 1987) alors que de grandes variations ont été observées au sein d'une même feuille de balata franc, *Manilkara bidentata* (Lodge *et al.* 1996). Cette dernière étude a également mis en évidence de fortes disparités d'assemblages d'endophytes entre feuilles d'un même arbre, ce qui a été de nouveau confirmé dans des études ultérieures (Joshee *et al.* 2009).

## **5) Rôle écologique des champignons de la phyllosphère**

De plus en plus d'études mettent en évidence l'influence des champignons de la phyllosphère sur la fitness des plantes hôtes. Par exemple, les pathogènes diminuent la fitness de leur hôte (Gilbert 2002 ; Newton *et al.* 2010) et agissent comme moteur de biodiversité (Bradley *et al.* 2008). Certaines espèces mutualistes améliorent la fitness de leur hôte en limitant les attaques d'insectes herbivores par la production d'alcaloïdes toxiques (Wilkinson *et al.* 2000), en limitant les infections par d'autres champignons pathogènes (Arnold *et al.* 2003), ou en augmentant la résistance aux stress environnementaux (Rodriguez & Redman, 2007). De plus, ils sont considérés comme dégradateurs précoces de la litière forestière, participant au recyclage de la matière organique (Osono, 2006). Ces organismes sont donc des acteurs majeurs structurant les communautés végétales (Clay & Holah, 1999 ; Bradley *et al.* 2008).

Certaines associations complexes, impliquant un virus infectant un champignon mutualiste d'une plante, peuvent permettre à cette plante de survivre à des conditions

extrêmes de température (65°C) durant plusieurs jours, alors que ni le champignon ni la plante ne le pourraient seuls (Redman *et al.* 2002 ; Márquez *et al.* 2007). De telles associations auraient un impact majeur dans le contexte du réchauffement climatique, en modifiant les tolérances physiologiques d'une plante au climat, et donc sa capacité à coloniser de nouveaux milieux ou à s'adapter à des nouvelles conditions environnementales.

## IV. Changement climatique et conséquences écologiques

### 1) Définition et scénarios

Les experts du Groupe Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat (GIEC) définissent le changement climatique comme une modification durable (de l'ordre de plusieurs décennies) des paramètres climatiques (température, précipitation) en moyenne et en variabilité, que ce soit pour des raisons naturelles ou anthropiques. Le changement climatique est une des conséquences majeures, et la plus médiatisée, des changements globaux. Selon le rapport du panel intergouvernemental sur le changement climatique (IPCC 2007), le climat s'est réchauffé d'environ  $0.74^{\circ}\text{C}$  ( $0.56 - 0.92$ ) au cours du 20<sup>ème</sup> siècle, avec une accélération du réchauffement au cours des 30 dernières années (Figure 10). Selon l'IPCC 2007, ce rapide changement climatique actuel est probablement causé par les activités humaines, par le rapide développement démographique et ses conséquences en termes de consommation des ressources naturelles et d'utilisation des terres. Le changement climatique actuel serait ainsi la conséquence d'une augmentation de la concentration dans l'atmosphère de gaz à effets de serre ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  et  $\text{NO}_2$  surtout) et des perturbations des cycles biogéochimiques (Vitousek, 1994), dont l'explication la plus probable sont les actions humaines.

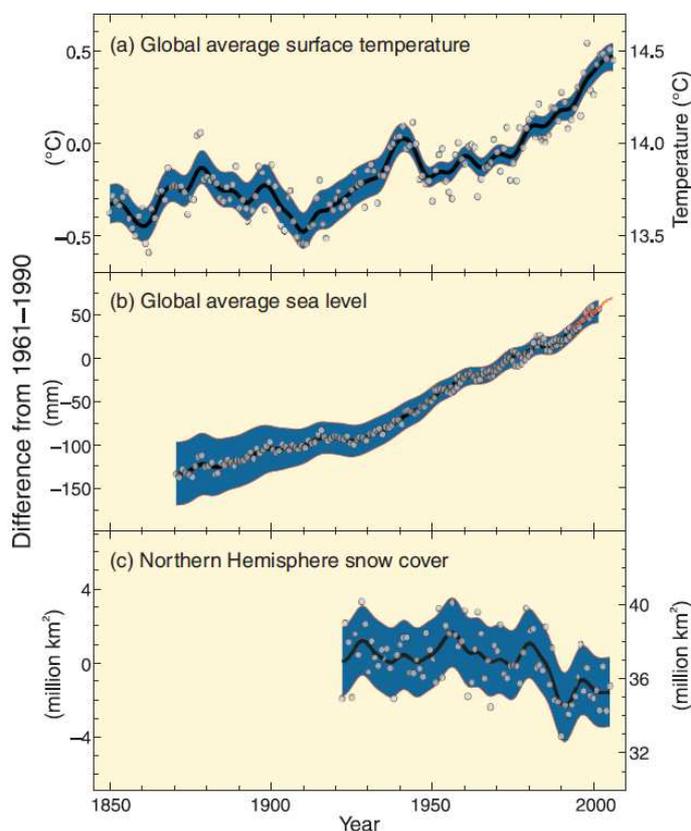
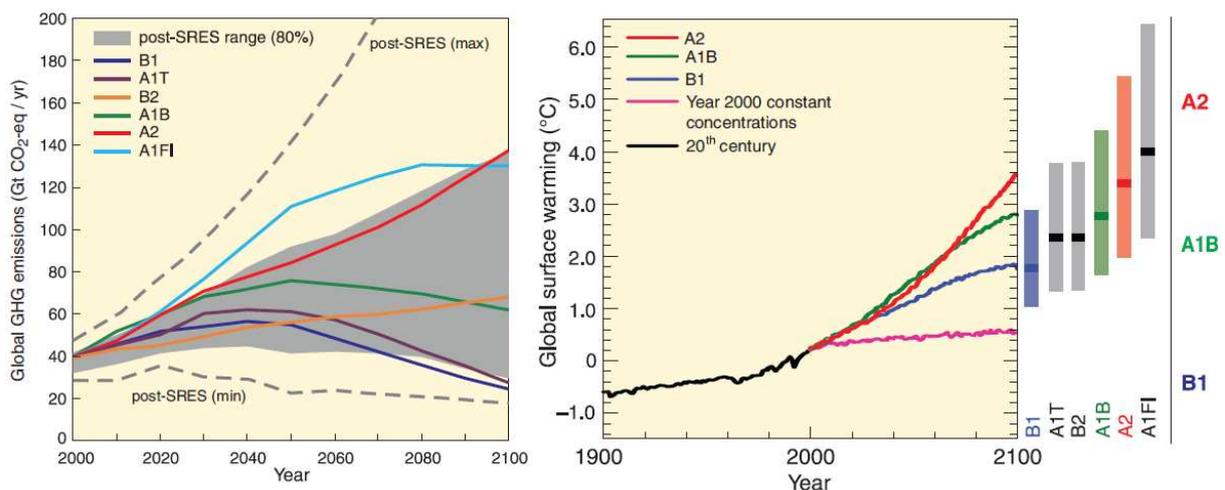
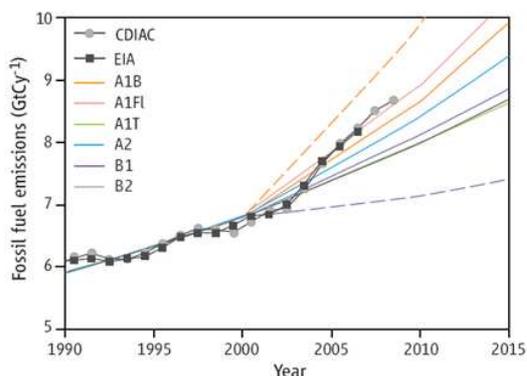


Figure 10 : Variations observées (a) de la température moyenne à la surface du globe, (b) du niveau moyen de la mer à l'échelle du globe, et (c) de la couverture neigeuse dans l'hémisphère nord en mars-avril. Tous les écarts sont calculés par rapport aux moyennes pour la période 1961-1990. Les courbes lissées représentent les moyennes décennales, et les cercles correspondent aux valeurs annuelles. Les zones ombrées représentent les intervalles d'incertitude (source IPCC 2007)

Les scénarios d'émissions de gaz à effet de serre (SRES) et d'augmentation de la température moyenne annuelle de l'IPCC se font sur la base de différents scénarios socio-économiques. On peut les classer en quatre familles explorant différentes alternatives de développement mondial en termes de dynamique démographique, développement technologique et fonctionnement de l'économie, avec leurs répercussions sur les dégagements de gaz à effet de serre et les augmentations de température associées (Figure 11). Le scénario A1 prévoit une croissance économique très rapide, avec un fort développement de technologies plus efficaces et un pic démographique au milieu du 21<sup>ème</sup> siècle. Cette famille de scénarios est divisée en trois sous scénarios en fonction de l'utilisation des énergies fossiles (A1FI : forte composante fossile, A1T : forte composante non fossile et A1B : équilibre entre les deux). Le scénario A2 est le plus pessimiste, avec une forte croissance démographique continue, un lent développement technologique et une faible croissance économique. Le scénario B1 prévoit une économie tournée vers les services et l'information, mais avec une démographie comparable au A1. Enfin le scénario B2, correspond à un niveau intermédiaire de développement économique et démographique, privilégiant l'action locale pour assurer un développement plus durable. Les publications récentes montrent que le scénario A1FI est aujourd'hui le plus probable, avec une croissance économique rapide et une consommation accrue en ressources fossiles (Figure 12). Selon ce scénario, la température moyenne annuelle pourrait grimper de 4°C.



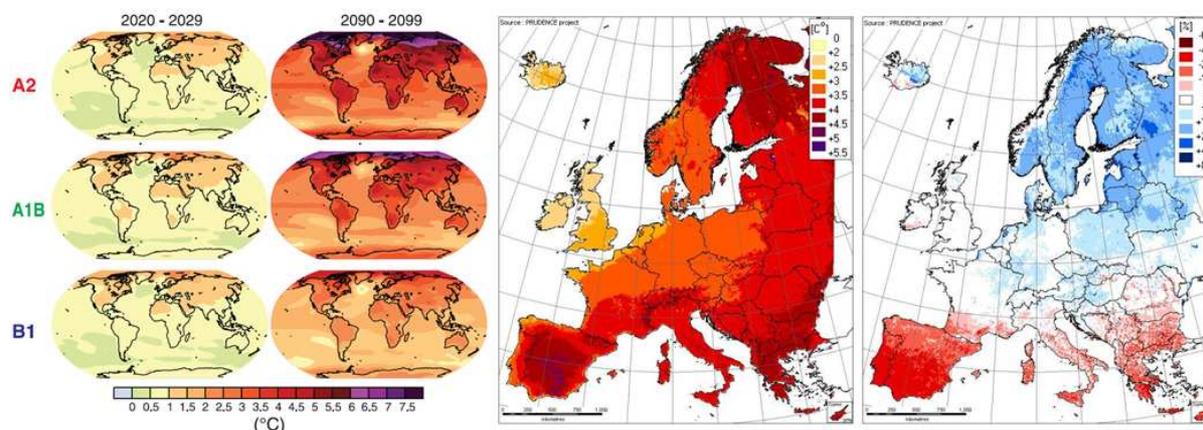
**Figure 11 : A gauche : différents scénarios d'émission de gaz à effet de serre au cours de 21<sup>ème</sup> siècle en l'absence de changement de politique climatique depuis 2000. A droite : prévisions d'augmentation de la température globale moyenne en fonction des différents scénarios. Source : IPCC 2007.**



Case	Temperature change (°C at 2090-2099 relative to 1980-1999) <sup>a, d</sup>	
	Best estimate	Likely range
Constant year 2000 concentrations <sup>b</sup>	0.6	0.3 – 0.9
B1 scenario	1.8	1.1 – 2.9
A1T scenario	2.4	1.4 – 3.8
B2 scenario	2.4	1.4 – 3.8
A1B scenario	2.8	1.7 – 4.4
A2 scenario	3.4	2.0 – 5.4
A1FI scenario	4.0	2.4 – 6.4

**Figure 12 :** A gauche : état des émissions de gaz issus des énergies fossiles en 2009 d'après l'Energy Information Administration (EIA) et le Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC) (McCarthy, 2009), deux organismes américains. A droite : chiffres prévisionnels d'augmentation de la température moyenne annuelle en fonction du scénario (IPCC 2007).

Ces changements ne seront probablement pas homogènes à l'échelle du globe. Les terres se réchaufferont probablement plus vite que les océans et les latitudes élevées de l'hémisphère nord seront davantage soumises aux augmentations de température (IPCC 2007, figure 13). Cette hétérogénéité dans les changements de température est également probable à l'échelle de l'Europe (Figure 13).

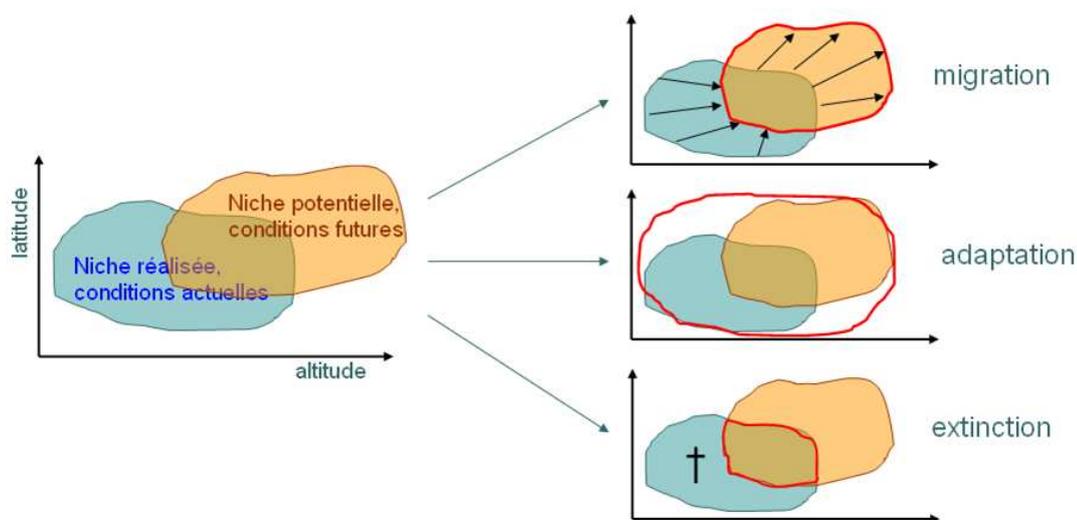


**Figure 13 :** A gauche : Augmentation moyenne de température prédite pour deux périodes du 21<sup>ème</sup> siècle par rapport à la moyenne 1980 – 1999 en fonction de différents scénarios (Source : IPCC 2007). Au milieu : Variation de température moyenne, à l'échelle de l'Europe, prédite pour la fin du 21<sup>ème</sup> siècle selon le scénario A2 par rapport aux normales 1961 - 1990 (Source : projet PRUDENCE). A droite : Variation de précipitation moyenne annuelle, à l'échelle de l'Europe, prédite pour la fin du 21<sup>ème</sup> siècle selon le scénario A2 par rapport aux normales 1961 - 1990 (Source : projet PRUDENCE, <http://peseta.jrc.ec.europa.eu/docs/ClimateModel.html>).

## 2) Réponses possibles des espèces

Des études empiriques ont montré que les réponses écologiques des espèces au changement climatique sont déjà perceptibles (McCarty 2001 ; Walther et al. 2002 ; Parmesan & Yohe 2003 ; Root et al. 2003 ; Thomas *et al.* 2004 ; Lenoir *et al.* 2008 ; Bellard *et al.* 2012). Ces réponses écologiques observées correspondent généralement à des changements de distribution géographique et des changements de phénologie (mais voir Bellard *et al.* 2012).

En effet, face à un changement climatique, les espèces peuvent répondre de trois manières différentes (Figure 14). Dans un premier cas, l'espèce arrive à migrer vers des conditions qui lui sont favorables, soit en se déplaçant si l'espèce est « mobile », soit avec des extinctions de populations dans les marges chaudes et des colonisations par de nouvelles populations aux limites froides si l'espèce est « immobile » (chez les plantes par exemple). Dans un deuxième cas, l'espèce peut s'adapter aux nouvelles conditions, soit par sélection de populations ayant la meilleure fitness dans l'environnement nouveau, soit par plasticité phénotypique. Enfin, si la migration ou l'adaptation sont impossibles ou trop lentes par rapport aux changements, la réponse sera de type extinction. Ces types de réponses ont été montrés pour une large gamme de groupes taxonomiques, incluant les plantes (Peñuelas & Broada 2003, Lenoir *et al.* 2008), les oiseaux (Devictor *et al.* 2008), le zooplancton (Beaugrand *et al.* 2009). Ces trois types de changements engendrent à leur tour des changements de composition des communautés, d'interactions biotiques au sein des communautés et de fonctionnement des écosystèmes.



**Figure 14** : Illustration des trois types de réponses possibles des espèces face au changement climatique.

## Objectifs de thèse et démarche

L'objectif principal de cette thèse a été d'étudier les effets potentiels du changement climatique sur la structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers et sur la distribution des espèces fongiques pathogènes des arbres forestiers en France. Nous avons utilisé deux approches pour étudier les effets du climat sur la distribution des espèces, i) l'étude de gradients altitudinaux (chapitres 2 et 3) et ii) la construction de modèles de niche bioclimatique (chapitre 3).

Les gradients altitudinaux présentent de fortes variations environnementales sur de courtes distances géographiques. De ce point de vue, ce sont des dispositifs naturels intéressants pour l'étude des adaptations des espèces aux conditions environnementales, en particulier à une contrainte thermique. Le gradient altitudinal que nous avons choisi d'étudier est un site atelier de BIOGECO. Il se situe dans les Pyrénées et s'étend de Lourdes (488m) à Lienz (1533m). Nous avons étudié les assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre (*Fagus sylvatica* L.). Ce choix a été motivé par le fait que cette essence est présente naturellement en basse et en haute altitude, mais aussi parce cette espèce est considérée comme particulièrement sensible au changement climatique (Gessler *et al.* 2007; Jump *et al.* 2007; Peñuelas *et al.* 2007). De plus, plusieurs études sur les assemblages fongiques de la phyllosphère ont été menées (Sieber & Hungentobler, 1987 ; Nechwatal & Osswald, 2001 ; Hendry *et al.* 2002 ; Danti *et al.* 2002 ; Unterseher & Schnittler, 2009). De façon préliminaire, nous nous sommes donnés pour objectif de décrire la diversité et de quantifier la variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre (chapitre 1).

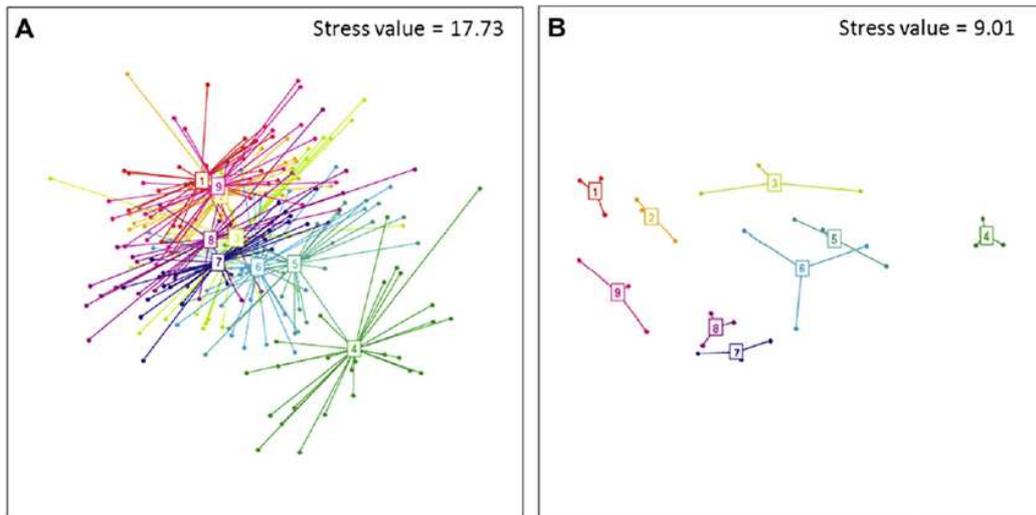
Les modèles de niche bioclimatique mettent en relation des données d'occurrence géographique d'une espèce avec des variables environnementales, permettant de définir une enveloppe bioclimatique dans laquelle l'espèce est présumée pouvoir vivre et se reproduire. Ils permettent donc de faire des prédictions sur la distribution d'une espèce à partir de jeux de données environnementales (Elith & Leathwick, 2009). Nous avons utilisé une base de données de suivi épidémiologique à long terme de pathogènes forestiers, à l'échelle de la France, afin de construire des modèles de niche et prédire les aires de distribution potentielles actuelles des différentes espèces à partir de variables climatiques. Ces modèles ont ensuite été utilisés dans le but de prédire l'évolution de ces distributions à la fin du siècle sous l'effet d'un scénario de changement climatique.

# Chapitre 1 : Variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère : la distance génétique prédomine sur la distance géographique dans une forêt de hêtre (*Fagus sylvatica* L.)

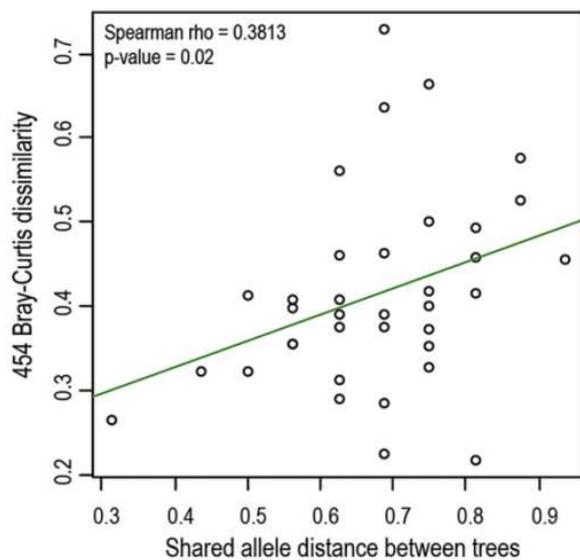
Tristan Cordier, Cécile Robin, Xavier Capdevielle, Marie-Laure Desprez-Loustau, Corinne Vacher.

Article publié dans *Fungal ecology*, 2012

**Résumé :** En dépit de leur rôle moteur dans la dynamique et la diversité des communautés de plantes, la variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère a rarement été explorée. Nous avons utilisé deux techniques culture-indépendantes (CE-SSCP et pyroséquençage 454) pour quantifier la variabilité spatiale des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre européen avec un plan d'échantillonnage hiérarchique comprenant quatre niveaux différents (arbre, branche, groupe de feuilles et feuille). Les assemblages fongiques se sont avérés très diversifiés, avec des proportions élevées d'espèces généralistes et cosmopolites. La majeure partie de la variabilité a été observée à la plus petite échelle spatiale, c'est-à-dire entre feuilles. Dans une même canopée, la dissimilarité entre les assemblages fongiques augmente généralement avec la distance entre les feuilles. Ce patron pourrait être généré par un gradient de traits foliaires et du microclimat. À l'échelle du peuplement, la dissimilarité entre les assemblages fongiques est corrélée avec la distance génétique plutôt que la distance géographique entre les arbres, en accord avec les concepts de génétique des communautés. En simulant une profondeur de séquençage réduite, la dissimilarité entre les assemblages fongiques reste significativement corrélée à la distance génétique entre les arbres. Ceci ouvre des perspectives pour concevoir des études à grande échelle abordant la relation entre la variation génétique des arbres et la variation des assemblages fongiques de la phyllosphère.



Représentation des dissimilarités entre les assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre sur une NMDS (gradation non métrique multidimensionnelle). Chaque couleur représente un arbre et chaque point représente un échantillon. A gauche, les assemblages ont été décrits avec la CE-SSCP et chaque échantillon représente une feuille. A droite, les assemblages ont été décrits avec du pyroséquençage 454 et chaque échantillon représente une branche.



Dissimilarités entre les assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre en fonction de la distance génétique entre arbres.



ELSEVIER

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

SciVerse ScienceDirect

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

## Spatial variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*)

Tristan CORDIER<sup>a,b,\*</sup>, Cécile ROBIN<sup>a,b</sup>, Xavier CAPDEVIELLE<sup>a,b</sup>, Marie-Laure DESPREZ-LOUSTAU<sup>a,b</sup>, Corinne VACHER<sup>a,b</sup>

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

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

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 July 2011

Revision received 5 October 2011

Accepted 11 October 2011

Available online ■

Corresponding editor:

Gareth W Griffith

#### Keywords:

Community genetics

Endophyte

Epiphyte

*Fagus*

Fungal community

Molecular fingerprint

Nuclear ribosomal internal

transcribed spacer

Phyllosphere

454 Pyrosequencing

Spatial variability

### ABSTRACT

Despite being major drivers of the dynamics and diversity of plant populations and communities, the spatial variability of phyllosphere fungal assemblages has been seldom explored. We used CE-SSCP and 454 pyrosequencing to quantify the spatial variability of European beech phyllosphere fungal assemblages with a hierarchical sampling design including four different spatial scales (tree, branch, group of leaves and individual leaf). Fungal assemblages were highly diverse, with high proportions of generalist and cosmopolitan fungi. The major part of the variability was at the smallest spatial scale, between individual leaves. Within a single tree canopy, dissimilarity between fungal assemblages generally increased with distance between leaves. This pattern may be driven by within-canopy gradients of leaf traits and microclimate. At the stand scale, dissimilarity between fungal assemblages was correlated with the genetic distance rather than the geographic distance between trees, consistent with the findings of community genetics studies. Our results were constant over a small simulated sequencing depth, providing opportunities for the design of large-scale studies addressing the relationship between the genetic variation of trees and the variation of associated phyllosphere fungal assemblages.

© 2012 Elsevier Ltd and The British Mycological Society. All rights reserved.

### Introduction

The phyllosphere, the habitat provided by the leaves of living plants, is one of the largest microbial habitats on Earth, with an estimated global surface area of more than  $4 \times 10^8$  km<sup>2</sup> (Morris & Kinkel 2002). It supports diverse and complex

microbial communities, including many genera of bacteria and fungi (Lindow & Brandl 2003; Jumpponen & Jones 2009; Redford *et al.* 2010). Phyllosphere fungal species include both epiphytes living on the leaf surface (Inácio *et al.* 2002; Lindow & Brandl 2003) and endophytes living within the tissues of the plant (Rodriguez *et al.* 2009). However, the distinction between

\* Corresponding author. INRA, UMR1202 BioGeCo, Domaine de l'Hermitage, 69 route d'Arcachon, F-33612 Cestas, Cedex, France. Tel.: +33 5 57 12 27 24; fax: +33 5 57 12 28 81.

E-mail address: [tristan.cordier@gmail.com](mailto:tristan.cordier@gmail.com) (T. Cordier).

1754-5048/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd and The British Mycological Society. All rights reserved.

doi:10.1016/j.funeco.2011.12.004

endophytic and epiphytic fungal species is ambiguous, because some epiphytic fungi also actively penetrate the epidermis or stomata and colonize internal leaf tissues (Viret et al. 1994). In this study, we define phyllosphere fungi as those species inhabiting both the surface and the interior of leaves (Jumpponen & Jones 2009), and fungal assemblages as the addition of all fungal species inhabiting the phyllosphere (Fauth et al. 1996).

Phyllosphere fungi influence the fitness of their host plants, either negatively as pathogens (Gilbert 2002; Newton et al. 2010) or positively, by increasing the stress tolerance of the plant (Rodríguez & Redman 2007), by reducing herbivory through the production of toxic alkaloids (Wilkinson et al. 2000) or by reducing the infection of plant tissues by pathogens (Arnold et al. 2003). Phyllosphere fungal assemblages also contribute to nutrient cycling, as early colonizers in leaf litter decomposition (Osono 2006). They are consequently major drivers of the dynamics and diversity of plant populations and communities (Clay & Holah 1999; Bradley et al. 2008). They also influence the dynamics of other taxonomic groups, such as phyllosphere bacteria, phytophagous insects and insect parasitoids (Omacini et al. 2001; Suda et al. 2009).

Despite the ecological importance of phyllosphere fungal assemblages, little is known about their diversity and spatial variability. Our knowledge of phyllosphere fungal diversity has long been limited by the use of culture-dependent methods, which are time-consuming and suffer from many biases. For instance, cultures systematically preclude biotrophic species and tend to be biased toward fast-growing fungi, although major advances toward overcoming this last problem have been made (Unterseher & Schnittler 2009). New culture-independent methods, such as molecular fingerprinting (Muyzer & Smalla 1998) and high-throughput DNA sequencing (Shendure & Ji 2008), have made it possible to obtain a more complete description of fungal diversity (see Buée et al. 2009 for soil fungal assemblages). In particular, high-throughput DNA sequencing can be used for the molecular identification of species through the use of barcode genes (Nilsson et al. 2010; Bengtsson et al. 2011). Such tools hold great promise for improving our understanding of the ecology of phyllosphere fungi.

Jumpponen & Jones (2009, 2010) used high-throughput DNA sequencing to study fungal assemblages inhabiting the bur oak (*Quercus macrocarpa*) phyllosphere. They reported the presence of highly diverse fungal assemblages. Assemblage richness and composition differed between adjacent environments (rural and urban), suggesting a non random spatial distribution of phyllosphere fungi. Very few molecular operational taxonomic units (MOTUs) were detected at high frequency and many were rare, as frequently reported in fungal metagenomic datasets (Unterseher et al. 2011). Their results also suggest that phyllosphere fungal assemblages are dominated by ascomycetes. However, many MOTUs could not be correctly assigned to any species in the absence of matching sequences in international nucleotide sequence databases, such as GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

In the present study, we used two culture-independent techniques, capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP) (Zinger et al. 2008) and tag-

encoded 454 pyrosequencing (Binladen et al. 2007), to assess the diversity and spatial variability of phyllosphere fungal assemblages in European beech (*Fagus sylvatica*). We used a hierarchical sampling design to estimate the spatial variability of phyllosphere fungal assemblages at tree, branch, group of leaves and individual leaf levels. Then, we investigated whether the geographic distance between leaves or trees could account for the dissimilarity of their fungal assemblages. At the stand level, we further investigated whether two alternative distances (the phenological and genetic distances between trees) were better at explaining the dissimilarity of fungal assemblages than the geographic distance.

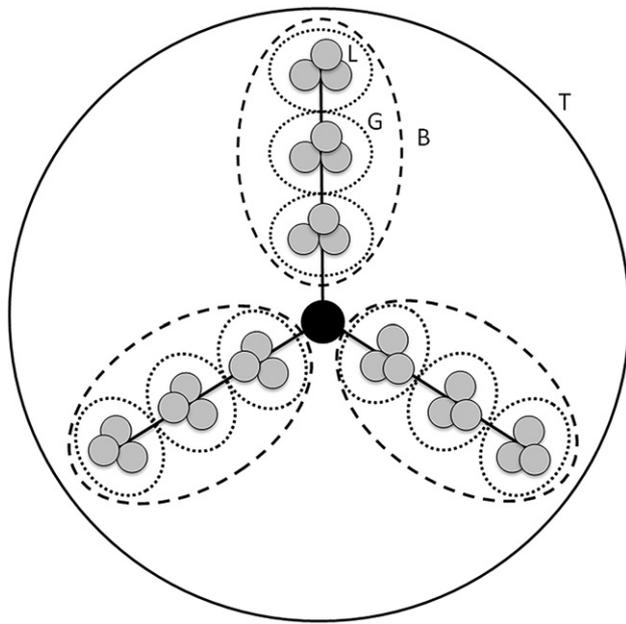
## Materials and methods

### Study site and hierarchical sampling design

The forest of Laveyron (GPS +43° 45' 51.32", -0° 13' 13.86") is a mixed oak-beech stand managed by the *Office National des Forêts* (ONF: <http://www.onf.fr/>). Nine beech trees, separated by distances of a few meters to about 300 m, were selected on the basis of height (all about 20 m high) and circumference (from 180 cm to 250 cm). Trees were geo-referenced with a GPS system. On 27 May 2009, three branches per tree were sampled at a height of about 7 m above the ground. The three branches were chosen on the basis of their orientation (north, south-east and south-west). We collected nine leaves from each branch: three leaves about 1 m from the trunk, three leaves in the middle of the branch (about 2 m from the trunk) and three leaves from the most distal part of the branch, about 3 m from the trunk (Fig 1). Each sampled leaf was the second from the base of the twig, to minimize the effect of leaf age within trees. We thus collected a total of 243 leaves (nine trees × three branches × three groups of leaves on the branch × three leaves), which were placed in individual filter paper envelopes, brought back to the laboratory, dried and stored at room temperature (in their envelopes) until DNA extraction.

### DNA extraction

Under a laminar flow hood, four discs of 2 cm<sup>2</sup> each were cut from each leaf and placed in a well of an autoclaved DNA extraction plate. The punch was sterilized between each leaf sample using 70 % ethanol and a flame. One metallic bead was added to each well and the plant material was ground into a homogeneous powder with a Geno/Grinder 2010 (SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ, USA). Total DNA was then extracted with a CTAB buffer, with the addition of β-mercaptoethanol (0.5 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and proteinase K (20 mg/ml, Sigma-Aldrich). Each well was filled with 400 μl of the CTAB extraction buffer, heated and shaken at 60 °C for 2 hr in an incubator (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA). Samples were treated with 320 μl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, pH = 8), briefly mixed, centrifuged at 364g for 10 min at 4 °C, and supernatant was transferred into novel autoclaved plates. DNA was precipitated overnight using absolute isopropanol at -20 °C, pelleted



**Fig 1 – Hierarchical sampling design used to estimate the spatial pattern of variability of phyllosphere fungal assemblages. The four spatial levels studied are circled with different lines: tree (T, continuous line), branch (B, dashed line), group of leaves (G, dotted line), leaf (L, circles). The diagram represents a tree canopy seen from above, with the circle in the middle representing the tree trunk and the three lines representing the three sampled branches. Branches are oriented from each other at an angle of 120°, and groups of leaves on a branch are separated from the nearest neighboring group of leaves by a distance of 1 m.**

by centrifugation (5000 rpm for 10 min at 4 °C), double washed in 70 % ethanol (–20 °C), dried for 1 hr in a speed vac plus (Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA), and eluted in 50  $\mu$ l ultra-pure water (Sigma–Aldrich). DNA was quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and concentration was adjusted to 5 ng  $\mu$ l<sup>–1</sup> with ultra-pure water (Sigma–Aldrich).

#### PCR amplification of *rITS1*

PCR amplification targeted the *rITS1* (ribosomal internal transcribed spacer 1) of the nuclear ribosomal repeat unit, which has been identified as a candidate barcoding locus for the identification of fungi to species level (Nilsson *et al.* 2009; Seifert 2009). The primer pair used was ITS1F (Gardes & Bruns 1993), for fungus-specific amplification, and the universal primer ITS2 (White *et al.* 1990). PCR was performed in 96-well plates, with randomization and the use of a robotic pipettor (Hamilton, Reno, NV, USA). The pit boards were avoided and filled with 25  $\mu$ l water (to prevent Peltier effects). Reactions were performed in a volume of 25  $\mu$ l containing 1 $\times$  buffer (Eurogentec, Liege, Belgium), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 mM of each dNTP, 200 nM of each primer, 0.5 units of *Taq* polymerase (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 10 $\times$  bovine serum albumin (Bio-Rad),

and 2  $\mu$ l of environmental DNA (i.e. 10 ng). After initial denaturation at 95 °C for 5 min, PCR was carried out with 30 cycles of 95 °C for 30 s, 54 °C for 1 min, 72 °C for 1 min 30 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. Extraction- and PCR-negative controls were included on each plate. No PCR amplicon was detected in these negative controls.

#### CE-SSCP of *rITS1* amplicons

Fungal diversity was characterized by CE-SSCP, with the ITS2 primer labeled at the 5' end with a fluorochrome (6FAM). PCR was performed on the DNA sample from each leaf. Each PCR product was diluted by a factor of four in sterile water (Sigma–Aldrich) and 1  $\mu$ l was added to 8.8  $\mu$ l of formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 0.2  $\mu$ l of ROX 400HD ladder (Applied Biosystems). The samples were denatured by heating for 5 min at 95 °C and cooling on ice for 10 min, immediately before loading onto a four-capillary ABI 3130 machine (Applied Biosystems). Migration was allowed to occur for 45 min at 32 °C (Zinger *et al.* 2008) with default settings used for all other parameters.

All readable molecular fingerprint profiles were aligned with the internal ROX ladder and normalized with the R package StatFingerprints v1.3 (Michelland *et al.* 2009a; R Development Core Team 2010). This yielded a matrix in which leaf samples were indicated in rows and fluorescence values (2766 scans) in columns. A fluorescence profile may be seen as a quantitative descriptor of the fungal assemblage of a sample. Larger differences in fluorescence scans between profiles indicate a greater dissimilarity in composition between samples (Michelland *et al.* 2009b).

#### 454 Pyrosequencing of *rITS1* amplicons

Fungal diversity was also characterized by 454 pyrosequencing, with Titanium fusion primers used for PCR amplification. The ITS2 reverse primer included the A adaptor, a five-nucleotide tag and the template-specific sequence, whereas the ITS1F forward primer contained the B adaptor (Table S1). This primer design generated reverse sequences across ITS1, thus minimizing sequencing of the conserved 3' end of the nuclear small subunit RNA gene (nSSU), because the ITS2 primer matches less far in the 5.8S gene than does the ITS1F primer in the nSSU.

We did not use this method to study the variability of fungal assemblages between leaves from the same branch. We therefore pooled the nine DNA samples from each branch. We thus obtained 27 DNA samples, corresponding to the 27 branches sampled (nine trees  $\times$  three branches per tree). Three PCR were performed on each sample, to account for heterogeneous amplification. The three PCR products were pooled and purified with the AMPure XP purification kit (AgenCourt Bioscience, Fullerton, CA, USA), which effectively eliminates primer dimers. The cleaned products were quantified, and 100 ng of each of the 27 samples was pooled in a single tube. This pool was sequenced in a region corresponding to one-eighth of a 454 GS-FLX Titanium sequencer (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) sequencing plate, at the Genoscope, Evry, France. With a theoretical yield of 100 000 sequences per region, we expected a sequencing depth of

almost 3700 sequences per sample. Raw data are available upon request.

The 454 dataset was demultiplexed with the Ribosomal Database Project pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>), using the following quality filters: no mismatch was allowed in the five-nucleotide tag, the ITS2 primer sequence had to be retrieved with a maximum edit distance of two (the edit distance is the number of steps required to transform a sequence into another by insertion, deletion or substitution), a minimum sequence length of 100 bp, fewer than three ambiguous nucleotides per read and a quality score for base calling exceeding 20, on average, across the whole read. The sample files were pooled into a single Fasta file (keeping the sample information in each read entry), and the highly variable ITS1 was extracted with the perl program ITS Extractor (Nilsson et al. 2010). Forward and reverse pyrosequencing primers were blasted against the ITS1 dataset to check extraction efficiency, and matching sequences were removed. The ITS1 locus in fungi was shown to have a median length of 183 bp among 4185 species (Nilsson et al. 2008). In our dataset, the median length was of 166 bp, ranging from 52 bp to 400 bp. We thus decided to remove ITS1 sequences shorter than 100 bp.

This cleaned dataset was clustered into molecular operational taxonomic units (MOTUs) with a 97 % similarity threshold, by using the UCLUST algorithm (Edgar 2010) implemented in the *pick\_otus* function of the Quantitative Insight Into Microbial Ecology toolkit (QIIME 1.1, Caporaso et al. 2010). Before MOTU clustering, a preliminary clustering was carried out with a 100 % similarity threshold, and the groups of identical sequences obtained were sorted in descending order of abundance. The most abundant sequences were then used as the seeds for clustering. This pre-sorting on the basis of abundance is an important step of MOTU clustering, because the most abundant sequences are more likely to be “true” biological sequences, whereas less common sequences or singletons may be PCR or sequencing artifacts. MOTU clustering was performed with the optimal flag option, which allows finding the optimal alignment between two sequences before calculating their similarity.

Each seed sequence was compared with the sequences deposited in GenBank, with the BLASTN algorithm (Altschul et al. 1997). Environmental sequences were first excluded for the purposes of taxonomic identification. We applied a threshold of at least 97 % similarity over at least 90 % of the query length of a fully annotated accession for the assignment of a species name to a MOTU or for the assignment of a genus name when the annotated accession contained only the genus name. Environmental sequences were then included for characterization of the remaining MOTU and the same assignment threshold was used to assign our MOTUs to environmental sequences deposited in GenBank.

The number of sequences per MOTU was considered a proxy for the abundance of the associated molecular species (Unterseher et al. 2011 but see Amend et al. 2010). The composition of the fungal assemblages was therefore represented by a quantitative matrix giving the relative abundance of each MOTU in each sample. However, as the relationship between the number of sequences and species abundance is uncertain (Amend et al. 2010), we also computed

the corresponding presence–absence matrix. We built one dataset with “core” MOTUs only and one dataset with “satellite” MOTUs only. Core MOTUs were defined as MOTUs present in at least half the samples, whereas satellite MOTUs were MOTUs present in less than half the samples (Unterseher et al. 2011). Finally, four rarefied datasets, with 50, 100, 200 and 300 sequences per sample, were constructed with the *multiple\_rarefaction* function in QIIME, to assess the robustness of our results to variations in sequencing depth. This function randomly samples the quantitative matrix to build the rarefied dataset.

### Statistical analyses

Compositional dissimilarity of fungal assemblages between samples was estimated with the Bray–Curtis dissimilarity index (Bray & Curtis 1957), and pair-wise dissimilarities between samples were analyzed by a non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot. NMDS was performed with the *metaMDS* function of the R *vegan* package (Oksanen et al. 2010). The Bray–Curtis dissimilarity matrix obtained from the CE-SSCP dataset was then analyzed in a hierarchical experimental design with three factors (tree, branch and group of leaves, all considered random) using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA, see Anderson 2001). The Bray–Curtis dissimilarity matrices obtained from the 454 sequencing datasets were analyzed with a one-way model (tree considered random). The multivariate component of variation for each spatial scale was then calculated from the mean squares of the PERMANOVA, using the method of moments (Searle et al. 1992). This calculation yielded additive components of variation (Anderson et al. 2011). Analyses of variance were performed with the *adonis* function of the R *vegan* package (Oksanen et al. 2010), by using 999 permutations.

We investigated whether the geographic distance between leaves within a tree canopy could account for the dissimilarity of their fungal assemblages, by estimating the pair-wise distances between all groups of leaves within a tree canopy. The correlation between the Bray–Curtis dissimilarity matrix (calculated from the CE-SSCP dataset averaged by group of leaves) and the geographic distance matrix was then assessed with a Mantel test (Spearman’s rank correlation, 999 permutations) for each of the nine trees. Mantel tests were performed with the *mantel* function of the R *ecodist* package (Goslee & Urban 2007).

Finally, we investigated whether the geographic distance between trees within a forest stand could account for the dissimilarity of their fungal assemblages, by calculating the geographic distances between all trees (based on their GPS positions). The phenological distance and the genetic distance between all trees were also estimated and tested as alternative distances. Phenological distance may account for fungal assemblage structure, through differences in the early colonization of leaves (Saikkonen et al. 1998), whereas genetic distance may account for fungal assemblage structure through differences in plant phenotype (Whipps et al. 2008). The date of bud burst was defined as the day on which half the canopy buds had hatched (Vitasse et al. 2009) and the phenological distance between two trees was defined as the absolute

number of days between bud bursts. The trees were genotyped for eight microsatellite loci (Lefèvre et al., 2011, see Tables S2 and S3) and we calculated the pair-wise genetic distance (DAS distance, i.e. shared allele distance) between all trees, with the Population program (version 1.2.32, Langella 1999, unpublished). As the geographic, phenological and genetic distances were calculated between trees (and not between leaves or branches), we averaged the CE-SSCP profiles for each tree and calculated the relative abundance of MOTUs for each tree. We then calculated the corresponding Bray–Curtis dissimilarity matrices. We performed partial Mantel tests with the *mantel* function of the R *ecodist* package (Spearman's rank correlation, 999 permutations), to investigate whether the dissimilarity in the composition of phyllosphere fungal assemblages increased with the geographic, phenological and genetic distance between trees.

## Results

### Species richness and composition of the phyllosphere fungal assemblage

In total, 123 163 sequences were obtained from the 1/8th 454 pyrosequencing run. The cleaned dataset comprised 96 130 sequences, divided into 27 samples, each corresponding to a branch. The mean number of sequences per sample was 3560, with a range of 386–6920 sequences per sample. The clustering of these sequences, with a threshold of 97 % similarity, gave a total of 1604 MOTUs. Among them, we identified five plant MOTUs, representing 159 sequences (including 134 sequences from European beech). These MOTUs were removed from the dataset before statistical analyses. The final dataset comprised 1599 fungal MOTUs, including 560 singletons. The mean number of MOTUs per branch was 240 (SD = 76) and the mean number per tree was 468 (SD = 109). We defined 118 fungal MOTUs as constituting the “core” of the assemblage (Table S4), with 12 of these MOTUs accounting for more than 1 % of the total number of sequences of the dataset (Table 1).

We were able to assign 406 of the 1599 fungal MOTUs to species level and 128 to genus level. The remaining 1065 MOTUs were above the threshold but corresponded to insufficiently annotated accessions (111 MOTUs), were below the threshold (550 MOTUs), did not match any annotated GenBank accession but matched environmental sequences (154 MOTUs), or did not match any GenBank accession (250 MOTUs). Fifty-two of the taxonomically assigned species were represented by several different MOTUs (two to 29 MOTUs), yielding 226 unique species. The number of MOTUs per species was significantly correlated with the number of sequences assigned to the species concerned (Spearman's  $\rho = 0.55$ ,  $p < 0.001$ ). Thus, more abundant species are generally divided into larger numbers of different MOTUs. The most abundant species were two ascomycetous yeasts, *Lalaria inositophila* (11 % of the total number of sequences; 29 MOTUs) and *Taphrina carpini* (10 %; 27 MOTUs). It is noteworthy that these two abundant species may be closely related because *Lalaria* is used as an anamorph genus name when the teleomorph state (*Taphrina*) is unknown (Inácio et al. 2004). The

**Table 1 – Taxonomic assignment of the 12 most abundant MOTUs, based on BLAST analysis of MOTU seed sequences against GenBank. Coverage is the percentage of the query length covered by the alignment. Similarity is the percentage identity over the alignment. Closest matches with more than 97 % similarity over at least 90 % of the query length are shown in bold. The relative abundance of a MOTU is the number of sequences associated with that MOTU over the total number of sequences in the dataset. Source indicates the source of the sequence associated with the underlined accession**

GenBank accession	MOTU relative abundance	GenBank (environmental excluded)			GenBank (environmental included)		
		Closest match	Coverage/similarity	Putative taxon	Closest match	Coverage/similarity	Putative taxon
JF945443	19.76	AY239214	96/86	<i>Lalaria inositophila</i>	GQ999402	100/96	Uncultured fungus
JF946080	11.03	AY230777	94/80	<i>Woolisia mycorrhizal fungus</i>	GQ508562	100/99	Uncultured fungus
JF946013	10.48	<b>AY239214</b>	100/100	<i>Lalaria inositophila</i>	"	"	Phylloplane, <i>Prunus persica</i> , Lisbon, Portugal, Inácio et al. 2004
JF945320	9.15	AY239215	100/99	<i>Taphrina carpini</i>	"	"	Phylloplane, <i>Quercus pyrenaica</i> , Caramulo, Portugal, Inácio et al. 2004
JF945549	5.43	<b>JF440584</b>	100/100	<i>Aureobasidium pullulans</i>	"	"	Xylem of <i>Pinus migo</i> , Lithuania, Lygis et al. unpublished
JF945566	3.9	FN824490	66/89	<i>Cryptococcus stepposus</i>	GQ514146	65/94	Uncultured fungus
JF945021	3.41	AB109183	100/100	<i>Venturia hantimiana</i>	<b>FJ820756</b>	100/100	Uncultured fungus
JF945768	2.4	<b>FR668008</b>	100/100	<i>Mycosphaerella punctiformis</i>	"	"	Air filter sample, Germany, Fröhlich-Nowoisky et al. 2009 Eucalyptus globulus leaves, Spain, Sánchez Márquez et al. 2011
JF945651	2.29	EF687931	100/100	<i>Cryptococcus sp.</i>	<b>FJ762780</b>	100/100	Uncultured fungus
JF945444	1.4	AY239214	96/86	<i>Lalaria inositophila</i>	GQ999402	100/94	Uncultured fungus
JF945157	1.17	<b>HQ717401</b>	100/100	<i>Davidiella sp.</i>	<b>HQ873349</b>	100/100	Uncultured fungus
JF945269	1.05	<b>AJ853459</b>	100/100	<i>Rhodosporiidium lusitaniae</i>	"	"	Yeast strains isolated from alpine habitat, Austria, Bergauer et al. 2005

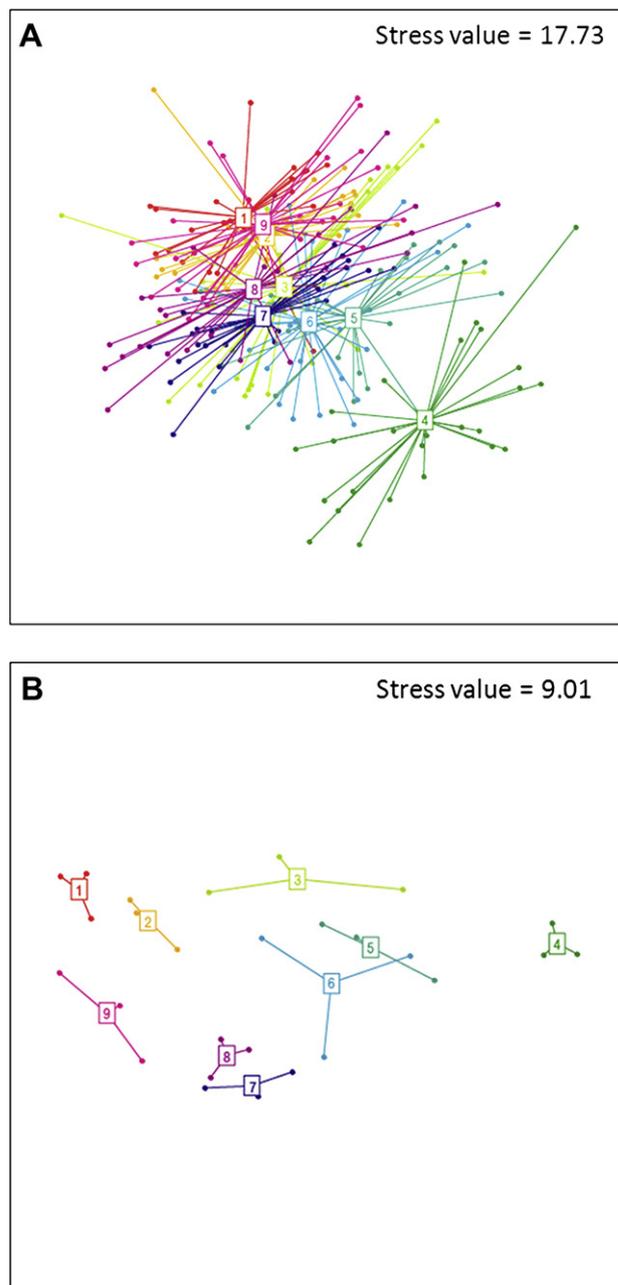
assigned MOTUs were distributed into 21 orders in Ascomycota (A) and 18 orders in Basidiomycota (B). Taphrinales (A) was the most frequently represented order, with almost 42 % of the taxonomically assigned sequences, followed by Capnodiales (A, 13 %), Dothideales (A, 12 %), Tremellales (B, 9 %), Sporidiobolales (B, 4 %), Cystofilobasidiales (B, 3 %), Erythrobasidiales (B, 2 %), Helotiales (A, 1 %), Pleosporales (A, 1 %), and Filobasidiales (B, 1 %). Each of the remaining orders accounted for less than 1 % of the taxonomically assigned sequences. Nine groups of MOTUs could not be assigned to the order level (*incertae sedis*), representing 9 % of the taxonomically assigned sequences.

A list of all the MOTUs, with their abundance and taxonomic assignment, is available in Table S4. The seeds of all MOTUs were retrieved from the demultiplexed sequence dataset (i.e. the dataset including nSSU and 5.8S in addition to ITS1) and seeds longer than 200 bp are available under GenBank accession nos. JF944899–JF946081. The entire set of fungal MOTUs ITS1 is available as a supplementary Fasta file.

### Spatial pattern of variability

The NMDS plot of the Bray–Curtis dissimilarity matrix obtained from the 233 readable CE-SSCP profiles revealed that intra-host variability of phyllosphere fungal assemblages was clearly greater than inter-host variability, with the leaves of each tree spread out over the ordinate axis (Fig 2A). Trees were moderately separated on the NMDS plot. Tree #4 was clearly different from the other trees, which displayed some degree of overlap (Fig 2A). Analysis of variance showed that phyllosphere fungal assemblages differed significantly between trees and between branches of the same tree, but not within a given branch (Table 2). Identical results were obtained when tree #4 was excluded (not shown). Variance partitioning confirmed that variability was greatest at the level of leaf replicates (i.e. between leaves from the same group of leaves). This level of variability, which corresponds to the residual variance, accounted for almost 69 % of the total variance. Dissimilarity in composition between trees accounted for 24 % of the total variance, whereas dissimilarity in composition between branches accounted for 7 % of the total variance (Table 2).

The NMDS plot of the Bray–Curtis dissimilarity matrix obtained for the total quantitative 454 sequencing dataset confirmed the inter-host variability of the phyllosphere fungal assemblages. Trees were well separated on the ordinate axis, with the branches of each tree relatively close together (Fig 2B). As with the CE-SSCP dataset, analysis of variance showed that the composition of fungal assemblages differed significantly between trees (Table 2). Compositional dissimilarity between trees accounted for almost 66 % of the total variance, whereas compositional dissimilarity between branch replicates (residual variance) accounted for 34 % of the total variance. Analysis of variance on the presence–absence 454 sequencing dataset also showed that the composition of fungal assemblages differed significantly between trees. However, the proportion of the variance accounted for by tree effect was smaller than that for the quantitative dataset, at only 17 % of total variance (Table S5). Analyses of variance on the quantitative datasets including core MOTUs only and



**Fig 2 – NMDS plot of phyllosphere fungal assemblages associated with nine beech trees. Each colour represents a tree and dots represent samples. In A, each sample is a leaf ( $n = 233$ ). Fungal composition of each sample was assessed by CE-SSCP on rITS1 amplicons. In B, each sample is a branch ( $n = 27$ ). Fungal composition of each sample was assessed by the 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The compositional dissimilarity between samples was assessed with the Bray–Curtis dissimilarity index.**

satellite MOTUs only also showed a significant effect of tree on the composition of phyllosphere fungal assemblages. Differences in the abundance of core MOTUs between trees accounted for 74 % of the total variance, whereas differences in the abundance of satellite MOTUs between trees accounted for 17 % of the total variance (Table 2). Finally, the effect of tree

**Table 2 – Permutational multivariate analysis of variance of the compositional dissimilarity between phyllosphere fungal assemblages associated with beech leaves ( $n = 233$ , CE-SSCP) and beech branches ( $n = 27$ , 454 pyrosequencing). The analyses are based on the sample  $\times$  fluorescence (CE-SSCP) and on the 454 quantitative sample  $\times$  MOTU matrix including all MOTUs (All), core MOTUs only (Core) or satellite MOTUs only (Sat). The compositional dissimilarity between assemblages was assessed with the Bray–Curtis dissimilarity index.**

Data	Source	df	Mean Sq	F	<i>p</i>	Explained variance (%)
CE-SSCP	Tree	8	0.45776	11.3216	<b>0.001***</b>	23.68
CE-SSCP	Branch	18	0.08032	1.9864	<b>0.001***</b>	7.34
CE-SSCP	Group of leaves	54	0.0413	1.0215	0.369	0.49
CE-SSCP	Residuals	152	0.04043			68.49
CE-SSCP	Total	232				
All	Tree	8	0.261333	6.7465	<b>0.001***</b>	65.7
All	Residuals	18	0.038736			34.3
All	Total	26				
Core	Tree	8	0.232056	9.4359	<b>0.001***</b>	73.8
Core	Residuals	18	0.024593			26.2
Core	Total	26				
Sat	Tree	8	0.52917	1.5974	<b>0.001***</b>	16.6
Sat	Residuals	18	0.33126			83.4
Sat	Total	26				

Significant tests are shown in bold, and \*  $0.01 \leq P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 \leq P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

was also significant in the four rarefied 454 sequencing datasets. The proportion of the variance accounted for by the tree effect decreased slightly with the simulated sequencing depth, from 55 % with 300 sequences per sample to 40 % with 50 sequences per sample (Table S6).

#### Geographic distance and dissimilarity between fungal assemblages

Mantel tests on the sample  $\times$  MOTU matrix obtained by CE-SSCP showed that the compositional dissimilarity between phyllosphere fungal assemblages increased significantly with the distance between leaves within the tree canopy, for five of the nine trees (Table 3). By contrast, geographic distance

between trees could not account for the compositional dissimilarity between trees. Phenological and genetic distances between trees were also insufficient to account for dissimilarity in composition between trees (Table 4).

Partial Mantel tests on the quantitative sample  $\times$  MOTU matrix obtained by 454 pyrosequencing confirmed that the geographic distance between trees could not account for phyllosphere fungal assemblage structure at the stand scale. However, a significant correlation was observed between the genetic distance between trees and dissimilarity in the composition of their associated assemblages (Table 4, Fig 3). Significant correlations were also obtained with compositional dissimilarity matrices derived from the core MOTU dataset (Table S7) and the four rarefied 454 sequencing datasets (Table S8).

**Table 3 – Mantel correlation between the geographic distance between group of leaves within a tree canopy and the compositional dissimilarity of fungal assemblages associated these groups of leaves. Species composition of each leaf was assessed by CE-SSCP of rITS1 amplicons and profiles were averaged by group of leaves before Mantel test. The compositional dissimilarity between assemblages was assessed with the Bray–Curtis dissimilarity index.**

	Spearman rho	<i>p</i> -value
Tree #1	0.197	0.183
Tree #2	0.3202	0.067
Tree #3	0.3483	<b>0.046*</b>
Tree #4	0.3393	<b>0.047*</b>
Tree #5	−0.009	0.51
Tree #6	0.479	<b>0.007***</b>
Tree #7	0.5086	<b>0.003***</b>
Tree #8	0.4142	<b>0.018*</b>
Tree #9	0.3109	0.065

Significant tests are shown in bold, and \*  $0.01 \leq P < 0.05$ ; \*\*  $0.001 \leq P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Discussion

### *The beech phyllosphere houses highly diverse fungal assemblages*

We showed, with high-throughput sequencing techniques, that a couple of dozen leaves from a single beech tree housed approximately 400 fungal molecular operational taxonomic units (or MOTUs). The fungal assemblages associated with beech leaves are therefore highly diverse, but it is difficult to determine the exact number of species within the tree canopy from the observed number of MOTUs. The true species richness is likely lower than the richness in MOTU, due to the combined effects of methodological and biological biases. First, PCR and sequencing artifacts are known to overestimate the perceived species richness (Quince *et al.* 2009; Reeder & Knight 2009; Dickie 2010), and such artifacts are even more likely to occur with abundant amplicon copies. Second, intragenomic variations of ribosomal genes and rITS, i.e. within a single isolate genome, are more common than was

**Table 4 – Mantel correlations between the geographic, phenological and genetic distance between trees within a forest stand and the compositional dissimilarity of phyllosphere fungal assemblages associated with trees. Species composition of each tree was assessed by CE-SSCP of rITS1 amplicons or 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The analyses are based on the sample  $\times$  fluorescence (CE-SSCP) and on the quantitative sample  $\times$  MOTU matrix including all MOTUs (454). The compositional dissimilarity between assemblages was estimated with the Bray–Curtis dissimilarity index.**

Dataset	Variable of interest	Partial predictor	Spearman rho	p-value
CE-SSCP	Geographic	Genetic, phenological	0.06683017	0.37
CE-SSCP	Phenological	Geographic, genetic	0.38810239	0.054
CE-SSCP	Genetic	Geographical, phenological	0.22474231	0.125
454	Geographic	Genetic, phenological	0.23632214	0.096
454	Phenological	Geographic, genetic	0.3193117	0.075
454	Genetic	Geographic, phenological	0.3496958	<b>0.03*</b>

Significant tests are shown in bold, and \*  $0.01 \leq P < 0.05$ .

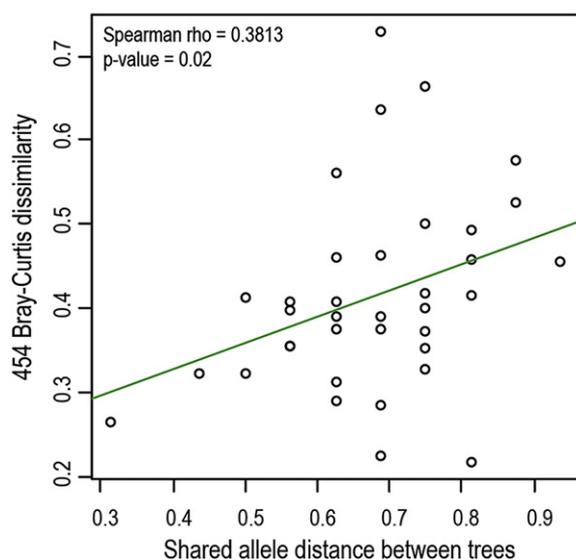
initially thought, with more than 5 % variation in some cases (Lindner & Banik 2011). These two biases increase the probability of observing rare rITS variants with increasing sequencing depth, and thus overestimate the MOTU richness. Third, intraspecific rITS1 variability may exceed 3 %, as this threshold is an operational compromise rather than a biological reality (Nilsson et al. 2008). These three factors may account for the representation of 52 species by several different MOTUs in our dataset. Conversely, the true species richness in a tree canopy may be much higher than the MOTU richness observed, for two reasons. First, we sampled only 0.02 m<sup>2</sup> of leaf surface per tree (four disks of 2 cm<sup>2</sup> each taken from 27 leaves). This constitutes probably only slightly more than 0.1 % of the leaf area of a single beech tree (Bréda 1999). Second, even with the sampling of such a small area, the recovery of the phyllosphere fungal assemblage was not exhaustive, as shown by the high proportion of singletons. For

these reasons, and despite methodological biases potentially leading to the overestimation of fungal species richness, we believe that the fungal species richness within the canopy of a single beech tree is greater than the number of MOTUs found in our samples.

#### **Many fungal species of the beech phyllosphere are generalists and have a cosmopolitan distribution**

Our study was conducted in a mixed oak-beech forest stand in the South of France. Seven of the 12 dominant MOTUs (Table 1) had previously been detected as phyllosphere fungi on other plant species and/or in other regions of the world. This suggests that the most abundant fungal species of the beech phyllosphere are generalist fungal species with a cosmopolitan distribution. *L. inositophila*, previously reported as an abundant phylloplane yeast on various plant species (Inácio et al. 2010), was the most abundant species in our dataset. This species, which is a *Taphrina* anamorph (Inácio et al. 2004), has also been found in the *Q. macrocarpa* phyllosphere in Kansas, USA (Jumpponen & Jones 2010). The latter study revealed significant seasonal trends of *Taphrina* spp. with a peak of abundance in early or mid-season. The high proportion of Taphrinales in our dataset could then be due to the early date of sampling (May). The ubiquitous yeast *Aureobasidium pullulans* and the plant pathogen *Mycosphaerella punctiformis* have already been identified as endophytes of beech in Germany (Sieber & Hugentobler 1987; Unterseher & Schnittler 2010). Two of the 12 most abundant MOTUs had previously been obtained from the *Q. macrocarpa* phyllosphere in Kansas (Jumpponen & Jones 2009; 2010) and two MOTUs displayed more than 95 % similarity with sequences obtained in a study on aerial fungal assemblage in Germany (Fröhlich-Nowoisky et al. unpublished). Among these four latter MOTUs, two may be taxonomically assigned (to *Cryptococcus* sp. and *Venturia hanliniana*).

We found that 162 MOTUs could be assigned to those obtained by Jumpponen & Jones (2009, 2010) from the *Q. macrocarpa* phyllosphere. These 162 MOTUs accounted for 18 % of the sequences in our dataset and included 112 MOTUs for which taxonomic assignment was possible. The assigned MOTUs common to both environments mostly belonged to *Cryptococcus* spp. (Tremellales, Basidiomycota), representing 55 % of the sequences of the 112 assigned MOTUs. The other



**Fig 3 – Compositional dissimilarity of phyllosphere fungal assemblages (454 dataset) as a function of shared allele distance between trees. Spearman's correlation coefficient and the p-value of the Mantel test are indicated on the figure. The correlation remains significant when geographic distance and phenological distance between trees are included as partial predictors (Table 4).**

shared assigned MOTUs belonged to the Sporidiobolales (14%), Erythrobasidiales (10%) and Taphrinales (8%). In addition, 46 MOTUs, accounting for 27% of all the sequences in our dataset, could be assigned to those obtained in two studies carried out by Fröhlich-Nowoisky *et al.* (2009 and unpublished) on aerial fungal assemblages in Germany. We found that 66% of the MOTUs common to these two studies belonged to the taxonomically ambiguous group of Dothideomycetes *incertae sedis*, 11% to the Cystofilobasidiales, 9% to the Helotiales and 6% to the Tremellales. A comparison of our results with those of these previous studies further confirmed the presence in the beech phyllosphere of a large number of ubiquitous fungal species (Levetin & Dorsey 2006).

#### **Cultivable endophytes may represent only a small proportion of the fungal biomass in the beech phyllosphere**

The order Diaporthales, Helotiales and Dothideales, which are thought to be the dominant orders of cultivable endophytic fungi associated with beech (Sieber 2007), represented only 0.26%, 1.5% and 11.5% of the assigned sequences, respectively. *Apiognomonia errabunda* (Diaporthales), a well known fungal species considered as the most abundant beech cultivable endophyte (Unterseher & Schnittler 2010), was represented by only 57 sequences, even if it was one of the core MOTUs. While cultivable endophytes are mainly composed of ascomycetes (Sieber 2007), cultivable epiphytic fungi are mainly composed of basidiomycetous yeasts (Inácio *et al.* 2010). Basidiomycetes represented 22% of the taxonomically assigned sequences, suggesting that many of the ascomycete MOTUs in our dataset may represent uncultivable endophytes or epiphytic fungi. Taken together, this suggests that cultivable endophytes represent only a small proportion of the fungal biomass in the phyllosphere.

#### **The fungal assemblages of the beech phyllosphere are spatially structured within the canopy**

The hierarchical sampling was designed to estimate the spatial variability of phyllosphere fungal assemblages at the scale of entire trees, single branches, groups of leaves and individual leaves. Our results suggest that the leaf level accounted for the greatest variability. By characterizing fungal assemblages with CE-SSCP, we found that the dissimilarity of fungal assemblages between leaves from the same group of leaves accounted for most of the total variance. This very high variability at such a fine spatial scale may be due to a sampling effect related to the small amount of leaf-surface sampled (four leaf discs, corresponding to 8 cm<sup>2</sup>). Indeed, epiphytic microbial communities tend to aggregate on individual leaves, due to the heterogeneity of the leaf surface, which provides multiple microhabitats (Kinkel 1997; Lindow & Brandl 2003). A small sampling surface may lead to an incomplete image of the fungal assemblage. Another explanation for such a high variability could be the stochastic early colonization just after bud burst, and subsequent priority effect possibly leading to particular assemblages on each leaf (Almany 2003). Joshee *et al.* (2009) isolated endophytic fungi from 50 leaves per tree on five different plant species. They, too, found that

the greatest variance was at the smallest spatial scale (i.e. between leaf replicates).

Distance between leaves within the canopy was shown to be associated with a greater dissimilarity of fungal composition for five of the nine trees. This effect could be due to a microclimatic gradient within the canopy (leaf-surface temperature and humidity), to a gradient in leaf traits within the canopy or to constraints on fungal dispersal within the canopy. Leaves in the outer canopy are directly exposed to sun light, ultraviolet and wind whereas relative humidity may be higher in the inner part of the canopy. This drastically different environment between inner and outer canopy is known to generate a high phenotypic plasticity in leaf traits (Garcia-Verdugo *et al.* 2009). For instance, leaf water content and leaf toughness are more variable within trees than between trees in birch (Suomela & Ayres 1994). Leaf macronutrient content (Jumpponen & Jones 2010) and leaf-surface sugars (Mercier & Lindow 2000) may also vary within the canopy. These differences in microclimate and leaf traits between the inner and the outer may impact the composition of fungal assemblages (Unterseher *et al.* 2007). For instance, the successful colonization of beech leaves by *A. errabunda* is strongly dependent on light exposure, probably through an effect of light on phenolic compounds (Bahnweg *et al.* 2005). In addition, small-scale dispersal of yeast cells or fungal spores, due to rain splash or insect vectoring (Coluccio *et al.* 2008), may account for within-canopy variations in fungal assemblages. However, our results show that many fungal species are ubiquitous and generalist, suggesting that fungal dispersal is not a constraint in the studied forest stand. Therefore, we believe that within-canopy variation in microclimate and in leaf traits are more likely explanations than constraints on dispersal for the observed pattern.

#### **Phyllosphere fungal assemblage structure at the stand scale may be shaped by the genetic variation of beech trees**

Despite the use of two entirely different molecular approaches to characterize fungal assemblages (454 pyrosequencing and CE-SSCP), both methods revealed significantly differing fungal assemblages between trees. Variability of MOTU abundance was greatest between trees, accounting for 66% of the total variance, whereas the proportion of the between-tree variance was much lower when only presence-absence was considered (only 17% of the total variance). Furthermore, the core MOTUs accounted for a higher proportion of the variance between trees than did the whole MOTU dataset. Thus, variability mostly reflected differences in the relative abundance of core MOTUs. Core MOTUs may therefore correspond to fungi actively interacting with beech trees, whereas satellite MOTUs may correspond mostly to passive and stochastically occurring fungi (Unterseher *et al.* 2011).

Neither geographic nor phenological distance could explain the structure of beech phyllosphere fungi. Instead, genetic distance of host trees could play a major role. The significant correlation between genetic distance of host trees and dissimilarity of fungal assemblages (for 454 data) suggest an effect of tree genotype on the associated phyllosphere fungal assemblages. It has been suggested that the microbial communities developing on leaves must relate to a large

extent to the phenotypic characteristics of the plant, which are controlled at least in part by genetic background (Whipps et al. 2008). Our study gives a first hint that the genetic variation of trees affects phyllosphere fungal assemblages. However, further studies addressing this topic will need to include the sampling of a larger number of trees and the analysis of a larger number of molecular markers, for the calculation of a more robust genetic distance matrix. It is noteworthy that we detected significant correlations between genetic variation of the host trees and the fungal assemblage structure, even at low simulated sequencing depth (50 sequences per sample). This suggests that greater multiplexing could be used, rather than increasing sequencing depth, to explore such a link.

## Acknowledgments

We thank Sophie Lefèvre for genotyping the nuclear microsatellites of the trees. We also thank Nicolas Feau and Virgil Fievet for their helpful comments on early versions of this manuscript and Julie Sappa from Alex Eldeman for English corrections. We also thank two anonymous reviewers for their comments and suggestions on the manuscript. This study was supported by joint grants from the French Ministry of Agriculture, Forest Health Department (Convention E17/08, no 22000285), by a European project, Biodiversity And Climate Change, A Risk Analysis (BACCARA, no 22000325) and by a Genoscope project (n°42 AP09/10).

## Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.funeco.2011.12.004.

## REFERENCES

- Almany GR, 2003. Priority effects in coral reef fish communities. *Ecology* **84**: 1920–1935.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **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 MJ, 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Australian Ecology* **26**: 32–46.
- Anderson MJ, Crist TO, Chase JM, Vellend M, Inouye BD, Freestone AL, Sanders NJ, Cornell HV, Comita LS, Davies KF, Harrison SP, Kraft NJB, Stegen JC, Swenson NG, 2011. Navigating the multiple meanings of  $\beta$  diversity: a roadmap for the practicing ecologist. *Ecology Letters* **14**: 19–28.
- Arnold AE, Mejia LC, Rolyo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15649–15654.
- Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D, Langebartels C, Nunn AJ, Rothenburger J, Schubert R, Wallis P, Muller-Starck G, Werner H, Matyssek R, Sandermann H, 2005. Beech leaf colonization by the endophyte *Apiognomonina errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions. *Plant Biology* **7**: 659–669.
- Bengtsson J, Eriksson K, Hartmann M, Wang Z, Shenoy B, Grelet G-A, Abarenkov K, Petri A, Alm Rosenblad M, Nilsson R, 2011. Metaxa: a software tool for automated detection and discrimination among ribosomal small subunit (12S/16S/18S) sequences of archaea, bacteria, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts in metagenomes and environmental sequencing datasets. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**: 471–475.
- Bergauer P, Fonteyne PA, Nolar N, Schinner F, Margesin R, 2005. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. *Chemosphere* **59**: 909–918.
- 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**: e197.
- Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH, 2008. Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters* **11**: 461–469.
- Bray JR, Curtis JT, 1957. An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs* **27**: 325–349.
- Bréda N, 1999. L'indice foliaire des couverts forestiers: mesure, variabilité et rôle fonctionnel. *Revue forestière française* **2**: 135–150.
- 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.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Tumbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**: 335–336.
- Clay K, Holah J, 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* **285**: 1742–1744.
- Coluccio AE, Rodriguez RK, Kernan MJ, Neiman AM, 2008. The yeast spore wall enables spores to survive passage through the digestive tract of *Drosophila*. *PLoS ONE* **3** (8): e2873. doi:10.1371/journal.pone.0002873.
- Dickie IA, 2010. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytologist* **188**: 916–918.
- Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460–2461.
- Fauth JE, Bernardo J, Camara M, Resetarits Jr WJ, Buskirk JV, McCollum SA, 1996. Simplifying the jargon of community ecology: a conceptual approach. *The American Naturalist* **147**: 282–286.
- Fröhlich-Nowoisky J, Pickersgill DA, Despres VR, Poschl U, 2009. High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12814–12819.
- García-Verdugo C, Granada-Yela C, Manrique E, de Casas RR, Balaguer L, 2009. Phenotypic plasticity and integration across the canopy of *Olea europaea* Subsp *guanchica* (Oleaceae) in populations with different wind exposures. *American Journal of Botany* **96**: 1454–1461.
- 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.

- Gilbert GS, 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 13–43.
- Goslee SC, Urban DL, 2007. The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* **22**: 1–19.
- Inácio J, Ludwig W, Spencer-Martins I, Fonseca Á, 2010. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 61–72.
- Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca Á, Amaral-Collaco MT, Spencer-Martins I, 2002. Estimation and diversity of phylloplane mycobiota on selected plants in a Mediterranean-type ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* **44**: 344–353.
- Inácio J, Rodrigues MG, Sobral P, Fonseca A, 2004. Characterisation and classification of phylloplane yeasts from Portugal related to the genus *Taphrina* and description of five novel *Lalaria* species. *FEMS Yeast Research* **4**: 541–555.
- Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR, 2009. Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycological Research* **113**: 1003–1015.
- 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, 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist* **186**: 496–513.
- Kinkel LL, 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 327–347.
- Lefèvre S, Wagner S, Petit RJ, De Lafontaine G, 2011. Multiplexed microsatellite markers for genetic studies of beech. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03094.x.
- Levetin E, Dorsey K, 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia* **22**: 3–12.
- Lindner DL, Banik MT, 2011. Intra-genomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. *Mycologia* **103**: 731–740.
- Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1875–1883.
- Mercier J, Lindow SE, 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 369–374.
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, 2009a. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1359–1363.
- Michelland RJ, Monteils V, Zened A, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Hamelin J, Fortun-Lamothe L, 2009b. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1642–1650.
- Morris CE, Kinkel LL, 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: significant contributions to research in related fields. In: Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ (eds), *Phyllosphere Microbiology*. American Phytopathological Society, St Paul, pp. 365–375.
- Muyzer G, Smalla K, 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 127–141.
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ, 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology* **18**: 365–373.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH, 2008. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* **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 Microbiology Letters* **296**: 97–101.
- 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 JF, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHM, Wagner H, 2010. *vegan: community ecology package*. R package version 1.17-4. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Muller CB, 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host–parasite interaction webs. *Nature* **409**: 78–81.
- Osono T, 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 701–716.
- Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT, 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639–U627.
- R Development Core Team, 2010. *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Redford AJ, Bowers RM, Knight R, Linhart Y, Fierer N, 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology* **12**: 2885–2893.
- Reeder J, Knight R, 2009. The 'rare biosphere': a reality check. *Nature Methods* **6**: 636–637.
- Rodriguez R, Redman R, 2007. More than 400 million years of evolution and plants still can't make it on their own: plant stress tolerance and habitat expansion via fungal symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **146**: 20.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314–330.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ, 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319–343.
- Sánchez Márquez S, Bills GF, Zabalgoitia I, 2011. Fungal species diversity in juvenile and adult leaves of *Eucalyptus globulus* from plantations affected by *Mycosphaerella* leaf disease. *Annals of Applied Biology* **158**: 177–187.
- Searle SR, Casella G, McCulloch CE, 1992. *Variance Components*. John Wiley and Sons, New York.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* **9**: 83–89.
- Shendure J, Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**: 1135–1145.
- Sieber T, Hugentobler C, 1987. Endophytic fungi in leaves and twigs of healthy and diseased beech trees (*Fagus sylvatica* L.). *European Journal of Forest Pathology* **17**: 411–425.
- Sieber TN, 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* **21**: 75–89.
- Suda W, Nagasaki A, Shishido M, 2009. Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere. *Microbes and Environments* **24**: 217–223.
- Suomela J, Ayres MP, 1994. Within-tree and among-tree variation in leaf characteristics of mountain birch and its implications for herbivory. *Oikos* **70**: 212–222.

- 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.
- Unterseher M, Reiher A, Finstermeier K, Otto P, Morawetz W, 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress* **6**: 201–212.
- Unterseher M, Schnittler M, 2009. Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* **113**: 645–654.
- 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.
- Viret O, Scheidegger C, Petrini O, 1994. Infection of beech leaves (*Fagus sylvatica*) by the endophyte *Discula umbrinella* (Teleomorph, *Apiognomonium errabunda*) – low-temperature scanning electron-microscopy studies. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **71**: 1520–1527.
- Vitasse Y, Delzon S, Dufrene E, Pontailleur JY, Louvet JM, Kremer A, Michalet R, 2009. Leaf phenology sensitivity to temperature in European trees: do within-species populations exhibit similar responses? *Agricultural and Forest Meteorology* **149**: 735–744.
- Whipps JM, Hand P, Pink D, Bending GD, 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1744–1755.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 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, Inc., New York, pp. 315–322.
- Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL, 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass–endophyte mutualism. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **13**: 1027–1033.
- Zinger L, Gury J, Alibeu A, 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. *Journal of Microbiological Methods* **72**: 42–53.

## Supplementary materials

Table S1 - 454 pyrosequencing primer sequences used for the amplification of fungal rITS1 and concatemer scheme

---

Titanium fusion adaptor	5' to 3'
adaptor A	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG
adaptor B	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG
Gene primers	
ITS2 (forward)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS1F (reverse)	CTTGATCATTAGAGGAAGTAA
Multiplex tags	
GTATG	ACACA
GTA CT	AGAGT
TCGCA	CTATA
TGATC	ACTGA
ATGCG	GTAGA
GCTGT	GAGTG
CACTA	TCTAT
CTAGC	AGTGC
ATCAG	TAGCG
CGACG	TGTAG
ACTAC	GCGTA
GCGCG	CACAC
GCAGC	TATGA
GCGAT	
Concatemer scheme	
5'- 454 adaptor A + multiplex tag + forward ITS2 -3'	
5'- 454 adaptor B + reverse ITS1F -3'	

---

Table S2 - Microsatellite loci and primer sequences used for the genotyping of beech trees

ID	Locus	Primer sequences (5' to 3')	Reference	Motif	Size (bp)
4	csolfagus_31	TCTATTGACACAAGAATAAGAACACC CTTGGCAAGAAAAGGGGATT	Vendramin (unpublished)	(AG)12	98-130
6	Sfc_1143	TGGCATCCTACTGTAATTTGAC ATTCCACCCACCATCTGTC	Asuka <i>et al.</i> (2004)	(AG)21	110-130
8	csolfagus_5	GGTTTCTAGCAAAATTGGCATT CCCAAAAGGCCCTACTACAA	Vendramin (unpublished)	(GA)10	155-189
9	FS1_15	TCAAACCCAGTAAATTTCTCA GCCTCAATGAACTCAAAAC	Pastorelli <i>et al.</i> (2003)	(GA)26	90-140
10	Sfc_0036	CATGCTTGACTGACTGTAAGTTC TCCAGGCCTAAAAACATTTATAG	Asuka <i>et al.</i> (2004)	(TC)23	90-115
11	csolfagus_6	GTTGTTGCTCACAGCAGTCG ACGCTTGGTCTTCTTGCACT	Vendramin (unpublished)	(AG)13	190-222
12	csolfagus_19	TGCCCATGAGGTTTGTATCA GCCGAATAACCCAGAAAACA	Vendramin (unpublished)	(TC)13	160-180
13	csolfagus_29	CACAACCTGCATTCCCTTTC GTTTGGCACTTTGGCTTGTT	Vendramin (unpublished)	(CT)11	130-150

Table S3 - Genotype of the nine beech trees studied for eight microsatellite loci

	locus 4	locus 6	locus 8	locus 9	locus 10	locus 11	locus 12	locus 13
Tree#1	110 122	126 126	169 171	111 111	102 102	215 221	174 174	140 148
Tree#2	112 116	122 124	173 173	99 113	106 108	215 217	174 180	138 140
Tree#3	116 124	124 124	167 171	113 121	108 108	215 221	162 170	138 138
Tree#4	112 122	126 126	169 175	121 125	104 106	213 217	164 168	138 140
Tree#5	116 116	114 122	175 175	111 113	104 106	213 219	168 180	138 138
Tree#6	116 116	122 126	173 175	111 115	106 108	213 219	168 174	138 138
Tree#7	112 122	122 124	173 175	111 119	96 106	209 215	164 170	138 148
Tree#8	116 116	114 114	171 173	111 117	96 108	213 221	170 180	138 138
Tree#9	116 122	122 124	171 175	111 111	102 104	215 221	162 162	140 148

Table S4 - List of all MOTUs, their relative abundance, taxonomic assignments by BLAST on GenBank (environmental excluded and included) and whether or not the assigned MOTUs were previously reported as beech pathogens (mentioned in Fungal Database, FD), as beech endophyte (Unterseher et al., 2009, 2010), as *Quercus macrocarpa* phyllosphere MOTU (Jumpponen & Jones, 2009, 2010) and as atmospheric MOTU (Fröhlich-Nowoisky et al., 2010). Plants MOTUs are in yellow. MOTUs with 97% or more of similarity on 90% or more of the query length are assigned to species (in green), to genus (in light green), or to the unidentified but reported MOTU (in blue)

Excel file :

<http://www.sciencedirect.com/science/MiamiMultiMediaURL/1-s2.0-S1754504811001401/1-s2.0-S1754504811001401-mmc3.zip/276917/html/S1754504811001401/acabd2f70210f9e19636cbd08b33d985/mmc3.zip>

Table S5 - Permutational multivariate analysis of variance of the compositional dissimilarity between phyllosphere fungal assemblages associated with beech branches (n=27). Species composition of each branch was assessed by 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The analyses are based on the presence-absence sample x MOTU matrix including all MOTUs. The compositional dissimilarity between assemblages was assessed with the Bray-Curtis dissimilarity index.

Source	df	Mean Sqs	F	p-value	Explained variance (%)
Tree	8	0.24467	1.6043	<b>0.001***</b>	16.8
Residuals	18	0.15251			83.2
Total	26				

Table S6 - Permutational multivariate analyses of variance of the compositional dissimilarity between phyllosphere fungal assemblages associated with beech branches (n=27). Species composition of each branch was assessed by 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The analyses are based on quantitative sample x MOTU matrices derived from rarefied datasets. The compositional dissimilarity between assemblages was assessed with the Bray-Curtis dissimilarity index. The sequencing depth is the number of sequences randomly taken from each sample.

Sequencing depth	Source	df	Mean Sqs	F	p-value	Explained variance (%)
300	Tree	8	0.289403	4.7308	<b>0.001***</b>	55.43
300	Residuals	18	0.061174			44.57
300	Total	26				
200	Tree	8	0.292772	4.3757	<b>0.001***</b>	52.95
200	Residuals	18	0.066908			47.05
200	Total	26				
100	Tree	8	0.31092	3.8876	<b>0.001***</b>	49.05
100	Residuals	18	0.079978			50.95
100	Total	26				
50	Tree	8	0.33693	3.0207	<b>0.001***</b>	40.25
50	Residuals	18	0.11154			59.75
50	Total	26				

Table S7 - Mantel correlations between the geographic, phenological and genetic distances between trees within a forest stand and the compositional dissimilarity of phyllosphere fungal assemblages associated with trees. Species composition of each tree was assessed by 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The analyses are based on the presence-absence sample x MOTU matrix including all MOTUs (Bin) and on the quantitative sample x MOTU matrix including core MOTUs only (Core) or satellite MOTUs only (Sat). The compositional dissimilarity between assemblages was estimated with the Bray-Curtis dissimilarity index.

Dataset	Variable of interest	Partial predictor	Spearman rho	p-value
Bin	geographic	genetic, phenological	0.23412631	0.134
Bin	phenological	geographic, genetic	0.2959378	0.118
Bin	genetic	geographic, phenological	0.26581662	0.088
Core	geographic	genetic, phenological	0.21506085	0.135
Core	phenological	geographic, genetic	0.322353	0.083
Core	genetic	geographic, phenological	0.3277852	<b>0.039*</b>
Sat	geographic	genetic, phenological	0.2159988	0.126
Sat	phenological	geographic, genetic	0.2708028	0.144
Sat	genetic	geographic, phenological	0.21888804	0.129

Table S8 - Mantel correlations between the genetic distance between trees within a forest stand and the compositional dissimilarity of phyllosphere fungal assemblages associated with trees. Species composition of each tree was assessed by 454 pyrosequencing of rITS1 amplicons. The analyses are based on quantitative sample x MOTU matrices derived from rarefied datasets. The sequencing depth is the number of sequences randomly taken from each sample. The compositional dissimilarity between assemblages was estimated with the Bray-Curtis dissimilarity index.

Sequencing depth	Variable of interest	Partial predictor	Spearman rho	p-value
300	genetic	-	0.3800536	<b>0.02*</b>
300	genetic	phenological, geographic	0.3561752	<b>0.027*</b>
200	genetic	-	0.3859579	<b>0.019*</b>
200	genetic	phenological, geographic	0.3593267	<b>0.026*</b>
100	genetic	-	0.3664124	<b>0.023*</b>
100	genetic	phenological, geographic	0.3285307	<b>0.036*</b>
50	genetic	-	0.3274518	<b>0.039*</b>
50	genetic	phenological, geographic	0.3088629	<b>0.047*</b>

[Fasta files:](#)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1754504811001401>

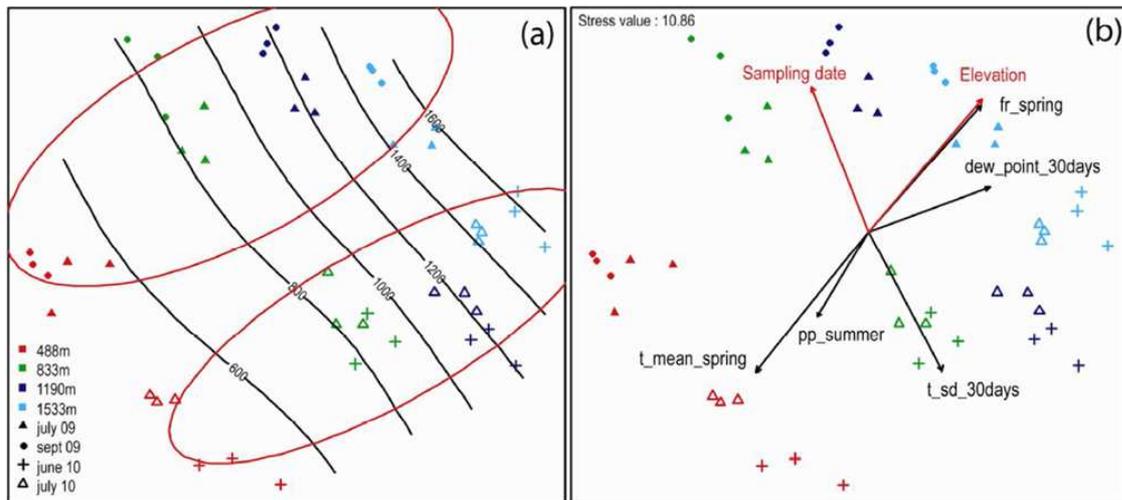
## Chapitre 2 : La composition des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre (*Fagus sylvatica* L.) varie le long d'un gradient d'altitude

Tristan Cordier, Cécile Robin, Xavier Capdevielle, Olivier Fabreguettes, Marie-Laure Desprez-Loustau, Corinne Vacher.

Article re-soumis à *New Phytologist* le 1<sup>er</sup> juin 2012.

### Résumé

- On connaît peu l'effet potentiel du réchauffement climatique sur les assemblages fongiques de la phyllosphère, en dépit de leur impact important sur la dynamique et la diversité des communautés végétales. La structure de phyllosphère assemblages fongiques le long de gradients d'altitude peut renseigner sur cet effet potentiel, puisque les gradients d'altitude présentent de fortes variations de température sur de courtes distances géographiques.
- Nous avons étudié les variations de composition des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre européen (*Fagus sylvatica*) sur un gradient de 1000 m d'altitude dans les Pyrénées françaises, avec du pyroséquençage 454.
- Nos résultats montrent que la composition des assemblages fongiques varie significativement entre les sites d'altitude, tant en termes d'abondance relative que de présence-absence d'espèces, et que les variations dans la composition de l'assemblage sont corrélées avec les variations des températures moyennes.
- Nos résultats suggèrent que le réchauffement climatique peut avoir une incidence sur l'abondance des espèces fongiques de la phyllosphère, y compris sur les espèces pathogènes latentes. Par exemple, l'abondance de *Mycosphaerella punctiformis*, un agent responsable de taches foliaires, décroît avec l'altitude et est susceptible d'étendre sa distribution en réponse au réchauffement climatique.



Représentation par gradation non métrique multidimensionnelle (NMDS) des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre le long du gradient pyrénéen (12 échantillons x 4 dates d'échantillonnage). A droite, les flèches noires indiquent les facteurs environnementaux les mieux corrélés avec les dissimilarités des assemblages. Les variables sont : t\_mean\_spring : température moyenne au printemps sur 30 ans, pp\_summer : précipitation moyenne en été sur 30 ans, t\_sd\_30 days : variation de température durant les 30 jours précédant l'échantillonnage, dew\_point\_30days : Nombre d'heures au dessus du point de rosée durant les 30 jours précédant l'échantillonnage, fr\_spring : Nombre de jours de gel moyen au printemps sur 30 ans. Les flèches rouges indiquent le gradient d'altitude et de date d'échantillonnage.

1       **The composition of phyllosphere fungal assemblages of**  
2       **European beech (*Fagus sylvatica* L.) varies significantly**  
3                               **along an elevation gradient**

4  
5       **Short running title:** Phyllosphere fungal assemblage structure along an elevation gradient

6       Tristan Cordier <sup>1,2</sup>, Cécile Robin <sup>1,2</sup>, Xavier Capdevielle <sup>1,2</sup>, Olivier Fabreguettes <sup>1,2</sup>, Marie-  
7       Laure Desprez-Loustau <sup>1,2</sup>, Corinne Vacher <sup>1,2\*</sup>

8       (1) INRA, UMR1202 BIOGECO, F-33610 Cestas, France

9       (2) Univ. Bordeaux, UMR1202 BIOGECO, F-33400 Talence, France

10       \* Author for correspondence: Corinne Vacher, INRA, UMR1202 BIOGECO, Domaine de  
11       l'Hermitage, 69 route d'Arcachon, F-33612 Cestas Cedex, France;  
12       corinne.vacher@pierroton.inra.fr; Phone: +33 (0)5 57 12 27 24; Fax: +33 (0)5 57 12 28 81

13  
14       Abstract: 186 words

15       Total word count for the main body of text: **5454**

16       Introduction: 623

17       Materials and methods: 2810

18       Results: 1092

19       Discussion: 828

20       Acknowledgements: 101

21       Number of figures: 2

22       Number of tables: 5

23       Supporting information: 2 tables (including one Excel file).

26 **Summary**

- 27 • Little is known about the potential effect of climate warming on phyllosphere fungal  
28 assemblages, despite their important impact on the dynamics and diversity of plant  
29 communities. The structure of phyllosphere fungal assemblages along elevation  
30 gradients may provide information about this potential effect, since elevation gradients  
31 correspond to temperature gradients over short geographic distances.
- 32 • We thus investigated variations in the composition of fungal assemblages inhabiting  
33 the phyllosphere of European beech (*Fagus sylvatica*) over a gradient of 1000 m of  
34 elevation in the French Pyrénées Mountains, by using tag-encoded 454  
35 pyrosequencing.
- 36 • Our results show that the composition of fungal assemblages varied significantly  
37 between elevation sites, in terms of both the relative abundance and the presence-  
38 absence of species, and that the variations in assemblage composition were well  
39 correlated with variations in the average temperatures.
- 40 • Our results therefore suggest that climate warming may alter both the incidence and  
41 abundance of phyllosphere fungal species, including endophytic latent pathogens. For  
42 example, *Mycosphaerella punctiformis*, a causal agent of leaf spots, showed  
43 decreasing abundance with elevation and is therefore likely to shift to higher  
44 elevations in response to global warming.

45

46 **Keywords:** phyllosphere, fungi, community structure, *Fagus sylvatica*, pathogens, climate  
47 change, elevation gradient, 454 pyrosequencing.

48

## 49 **Introduction**

50           The phyllosphere is the habitat provided by the leaves of living plants. It supports a  
51 great diversity of microorganisms (Lindow & Brandl 2003; Jumpponen & Jones 2009;  
52 Redford *et al.* 2010), living as epiphytes on the leaf surface (Inácio *et al.*, 2002; Lindow &  
53 Brandl 2003) or as endophytes within the tissues of the plant (Rodriguez *et al.*, 2009). In this  
54 study, we define phyllosphere fungal species as those species inhabiting both the surface and  
55 the interior of leaves (Jumpponen & Jones 2009) and we define an assemblage as the addition  
56 of all fungal species inhabiting the phyllosphere of the same plants at the same time (Fauth *et*  
57 *al.*, 1996). Phyllosphere fungi influence the fitness of their host plants, either negatively, by  
58 acting as pathogens (Gilbert 2002; Newton *et al.*, 2010), or positively, by increasing the stress  
59 tolerance of the plant (Redman *et al.* 2002), reducing herbivory through the production of  
60 toxic alkaloids (especially in grasses; Wilkinson *et al.*, 2000) or reducing the infection of  
61 plant tissues by pathogens (Arnold *et al.*, 2003). They are therefore important drivers of the  
62 dynamics and diversity of plant populations and communities (Clay & Holah, 1999; Bradley  
63 *et al.*, 2008). Phyllosphere fungi also influence the dynamics of other taxonomic groups, such  
64 as phyllosphere bacteria (Suda *et al.*, 2009), phytophagous insects and their parasitoids  
65 (Omacini *et al.*, 2001). Finally, they contribute to nutrient cycling, as early colonizers of leaf  
66 litter (Osono, 2006).

67           Our knowledge of phyllosphere fungal diversity has long been limited by the use of  
68 culture-dependent methods, which are time-consuming and suffer from many biases. For  
69 instance, culture-based approaches systematically exclude biotrophic species and tend to favor  
70 rapidly growing fungi, although major advances towards the resolution of this problem have  
71 been made (Unterseher & Schnittler, 2009). New culture-independent methods, such as high-  
72 throughput DNA sequencing (Shendure & Ji, 2008), have made it possible to obtain a more  
73 complete description of fungal diversity (Jumpponen & Jones, 2009, 2010), despite

74 sequencing errors which may lead to an over-estimation of species richness (Quince et al.  
75 2009). These new culture-independent methods can be used for the molecular identification of  
76 species through genetic barcoding (Nilsson *et al.*, 2009). They hold great promise for  
77 improving our understanding of the ecology of phyllosphere fungi and predicting their  
78 response to global warming.

79         Global warming is ongoing (IPCC 2007) and has already caused species distribution  
80 shifts and extinctions, and changes to community composition and ecosystem functioning  
81 (Thomas *et al.*, 2004; Parmesan, 2006). Studies of the effects of climate change have  
82 generally focused on higher plants (Peñuelas & Boada, 2003; Lenoir *et al.*, 2008) and animals  
83 (Root *et al.*, 2003; Devictor *et al.*, 2008). The potential response of fungal assemblages to  
84 climate change has been investigated principally in the soil system (Gange *et al.*, 2007, Sheik  
85 *et al.*, 2011; Yuste *et al.*, 2011; Meier *et al.*, 2010; Bahram *et al.*, 2011). The potential  
86 responses of phyllosphere fungal assemblages to global warming have been much less  
87 thoroughly explored (but see Hashizume *et al.*, 2008).

88         In this study we investigated the effects of elevation on the composition of  
89 phyllosphere fungal assemblages, because elevation gradients can be used as a proxy for  
90 temperature gradients over short geographic distances, thus constituting a natural experiment  
91 for studies of the effect of temperature (Körner, 2007). We studied the composition of  
92 phyllosphere fungal assemblages inhabiting the phyllosphere of European beech (*Fagus*  
93 *sylvatica* L.) over a gradient of 1000 m of elevation in the French Pyrénées Mountains. We  
94 used tag-encoded 454 pyrosequencing (i) to investigate changes in the composition of  
95 phyllosphere fungal assemblages with elevation, (ii) to test the hypothesis that temperature is  
96 the climatic factor best accounting for the elevation-related pattern and (iii) to analyze  
97 elevational patterns of species described as pathogenic to beech.

98 **Materials and methods**

99 *Study site and sampling design*

100 The study was conducted along an elevation gradient extending from 488 m asl  
101 (Lourdes, GPS +43°45'51", -0°13'13") to 1533 m asl (Lienz, GPS +42°53'32", -00°04'24") in  
102 the Gave valley of the French Pyrénées. We selected four stands distributed along this  
103 elevation range that contained a high proportion of beech (more than 50%) and were growing  
104 on north-facing slopes. Each elevation site was geo-referenced (Table 1). At each elevation,  
105 we defined three plots located about 50 m apart. Within each plot, we selected five trees that  
106 were located close together (less than 10 m apart) and were at least 10 m tall. We sampled  
107 three leaves, from different branches, from each tree. The sampled branches were located  
108 approximately seven meters above the ground and were oriented towards the north, south-east  
109 or south-west. Each of the sampled leaves was located in the middle of the branch, on a  
110 current-year shoot, and was the second leaf back from bud. This sampling procedure  
111 minimized the effect of leaf age within trees. The gradient was sampled four times (July 2009,  
112 September 2009, June 2010 and July 2010), and each sampling campaign was completed  
113 within one week. In total, we collected 720 leaves (4 sampling dates x 4 elevation sites x 3  
114 plots per site x 5 trees per plot x 3 leaves per tree), which were placed in individual plastic  
115 bags, each containing 10 ml of silica gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) to ensure that the  
116 leaves were completely dry within a few hours. The plastic bags were brought back to the  
117 laboratory and stored at 16°C until DNA extraction.

118 *Phyllosphere fungal assemblage data*

119 The composition of phyllosphere fungal assemblages was characterized at the plot  
120 level for each sampling date, by tag-encoded 454 pyrosequencing. Four discs, each with an  
121 area of 28 mm<sup>2</sup>, were cut from each side of the midrib of each leaf in a laminar flow hood.  
122 Each disc was placed in one of the wells of an autoclaved DNA extraction plate. The hole-

123 punch used to cut the discs was sterilized between leaves with 70% ethanol solution and a  
124 flame. A single metallic bead was added to each well and the plant material was ground into a  
125 homogeneous powder with a Geno/Grinder 2010 (SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ). Total  
126 DNA was then extracted with a CTAB phenol/chloroform/isoamyl alcohol protocol, with the  
127 addition of  $\beta$ -mercaptoethanol (0.5%, Sigma-Aldrich) and proteinase K (20 mg/ml, Sigma-  
128 Aldrich). Briefly, each well was filled with 400  $\mu$ l of the CTAB extraction buffer (8 mg of  
129 CTAB, 16 $\mu$ L at 0.5M of EDTA, 40 $\mu$ L at 1M of Tris HCl, 112  $\mu$ L at 5M of NaCl, 4 mg of  
130 PVP-40 and 232 ml of ultra-pure water) and heated at 60°C for two hours, with shaking, in an  
131 incubator (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). Samples were mixed with 320  $\mu$ l of  
132 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, pH=8), vortexed briefly and centrifuged at 364g  
133 for 10 minutes at 4°C. The aqueous phases were transferred to a new autoclaved plate. DNA  
134 was precipitated overnight in absolute isopropanol, at -20°C. It was collected by  
135 centrifugation (364g for 10 minutes at 4°C), washed twice in 70% ethanol (-20°C), dried for  
136 one hour in a Speed Vac Plus (Savant Instruments, Farmingdale, NY) and eluted in 50  $\mu$ l  
137 ultra-pure water (Sigma-Aldrich). DNA was quantified with a NanoDrop spectrophotometer  
138 (Thermo Scientific, Waltham, MA), and its concentration was adjusted to 10 ng/ $\mu$ l with ultra-  
139 pure water (Sigma-Aldrich).

140 PCR amplification targeted the ITS1 region (internal transcribed spacer 1) of the  
141 nuclear ribosomal repeat unit, which is considered to be the best available barcode for  
142 identifying fungi to species level (Nilsson *et al.*, 2009; Seifert, 2009; Schoch *et al.*, 2012).  
143 Titanium fusion primers were used for PCR amplification. The universal reverse primer ITS2  
144 (White *et al.*, 1990) included the A adaptor, one of 24 different five-nucleotide tags and the  
145 template-specific sequence, whereas the fungus-specific forward primer ITS1F (Gardes &  
146 Brown, 1993) contained the B adaptor (Table S1). Sequencing was unidirectional and started  
147 with the A adaptor. The primer design thus resulted in reverse sequences across ITS1. This

148 sequencing strategy allowed to minimize the sequencing of the conserved 3' end of the  
149 nuclear small subunit RNA gene (nSSU), because the ITS2 primer matches less far in the  
150 5.8S gene than does the ITS1F primer in the nSSU gene. It maximized the probability for  
151 incomplete sequences (which represented a non negligible amount of the raw dataset) to  
152 contain the informative ITS1 region.

153 DNA extracts were pooled by tree for PCR amplification. A single tagged primer was  
154 used for PCR amplification from the pooled DNA obtained from a given plot at a given  
155 sampling date. PCR was performed in sterile 96-well plates, avoiding the wells at the edge of  
156 the plate, which were filled with 20  $\mu$ l of water (to avoid Peltier effects). The reactions were  
157 performed in a volume of 20  $\mu$ l, containing 1x buffer (Eurogentec, Liege, Belgium), 2 mM  
158  $MgCl_2$ , 200 mM of each dNTP, 200 nM of each primer, 0.5 units of *Taq* polymerase (Bio-  
159 Rad, Hercules, CA), 10x bovine serum albumin (Bio-Rad), and 2  $\mu$ l of environmental DNA  
160 (20 ng). The PCR mixture was subjected to initial denaturation at 95°C for 5 minutes,  
161 followed by 30 cycles of 95°C for 30 seconds, 54°C for 1 minute, 72°C for 90 s, and a final  
162 extension at 72°C for 10 minutes. Extraction and PCR-negative controls were included on  
163 each plate. No PCR amplicon was detected in these negative control wells. Each PCR product  
164 was purified with the AMPure XP purification kit (AgenCourt Bioscience, Fullerton, CA) and  
165 quantified (NanoDrop). We combined 10 ng of each product in single tubes for 2009 and for  
166 2010.

167 We sequenced the PCR products in two different 454 runs. The 2009 DNA pool was  
168 sequenced on a 1/8<sup>th</sup> region of a sequencing plate, whereas the 2010 DNA pool was  
169 sequenced in a 1/4<sup>th</sup> region of a plate. A 454 GS-FLX Titanium sequencer (454 Life Sciences,  
170 Branford, CT) was used for sequencing, at the Genoscope, Evry, France. With a theoretical  
171 yield of 100 000 sequences per 1/8<sup>th</sup> region and 200 000 sequences per 1/4<sup>th</sup> region, we  
172 expected a sequencing depth of almost 3333 sequences per sample (a given plot at a given

173 sampling date) for the 2009 samples and 6666 sequences per sample for the 2010 samples.  
174 One sample in each 454 run was markedly less sampled than the others (65 and 208  
175 sequences in 2009 and 2010, respectively) and the tag-encoded primer involved was the same,  
176 suggesting an effect of the primer on pyrosequencing. We therefore included these two  
177 samples, amplified by PCR with a different tag-encoded primer, in another run as part of a  
178 different study. The 454 sff files are available from the European Nucleotide Archive  
179 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERP001056>).

180 The two 454 sequencing datasets were processed identically. Each dataset was  
181 demultiplexed with the *split\_library* function of the Quantitative Insight Into Microbial  
182 Ecology toolkit (QIIME 1.1, Caporaso *et al.*, 2010). The following quality filters were  
183 applied: no mismatch allowed in the five-nucleotide tag, ITS2 primer sequence retrieved with  
184 no mismatch, minimum sequence length of 100 bp, no ambiguous nucleotides allowed and  
185 mean quality score for base calling greater than 25 across the whole read. The highly variable  
186 ITS1 was extracted with the perl program ITS Extractor (Nilsson *et al.*, 2010). Forward and  
187 reverse pyrosequencing primers were blasted against the ITS1 dataset to check extraction  
188 efficiency, and matching sequences were removed. The ITS1 locus in fungi has been shown  
189 to have a median length of 183 bp in 4185 species from 973 genera (Nilsson *et al.*, 2008). In  
190 our dataset, the median length of this locus was 162 bp, ranging from 32 to 464 bp. We  
191 decided to remove ITS1 sequences of less than 100 bp, because a sufficient overlap between  
192 sequences is necessary for Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs) clustering.

193 The cleaned dataset was clustered into 97% similarity MOTUs with the UCLUST  
194 algorithm (Edgar, 2010) implemented in the *pick\_otus* function of QIIME. Before carrying  
195 out the actual MOTU clustering, a preliminary clustering at 100% similarity was performed  
196 and groups of identical sequences were sorted in decreasing order of abundance. The most  
197 abundant sequences thus became the seeds from which the final clustering process began.

198 This prior sorting on the basis of abundance is important in MOTU clustering (Edgar R,  
199 2011), because the most abundant sequences are more likely to be “true” biological  
200 sequences, whereas less common sequences or singletons may be PCR or sequencing  
201 artifacts. MOTU clustering was performed with the optimal flag option that allows finding the  
202 optimal alignment before calculating the similarity between two sequences.

203 Each seed sequence and singleton was compared with the sequences deposited in  
204 GenBank, with the BLASTN algorithm (Altschul *et al.*, 1997). We first excluded  
205 environmental sequences, for putative taxonomic identification. We applied a threshold of at  
206 least 97% similarity over at least 90% of the query length on a fully annotated accession for  
207 the assignment of a species name to a MOTU or the assignment of a genus name if the  
208 annotated accession was classified no further than the genus. Environmental sequences were  
209 then included for characterizing the environmental source of the remaining MOTUs. We used  
210 the same threshold previously used for the assignment of MOTUs to environmental sequences  
211 deposited in GenBank.

212 The number of sequences per non-singleton MOTU was considered to be a proxy for  
213 the abundance of associated molecular species (Unterseher *et al.*, 2011, but see Amend *et al.*,  
214 2010). The assemblage composition of the samples was therefore represented as a quantitative  
215 sample x MOTU matrix, giving the abundance (number of sequences) of each non-singleton  
216 MOTU in each sample (a given plot at a given sampling date). The sample sizes in the sample  
217 x MOTU matrix were unequal (ranging from 755 to 20495 sequences per sample). Therefore  
218 we applied the *multiple\_rarefaction* function in QIIME to the sample x MOTU matrix to  
219 build 30 rarefied quantitative datasets of 700 sequences per sample.

220 We also considered that the presence of a non-singleton MOTU within a sample  
221 indicates the presence of the associated molecular species within the sample. Therefore, from

222 the 30 rarefied quantitative datasets, we calculated 30 binary matrices. The use of binary  
223 datasets, in addition to quantitative datasets, is important because it allows investigating  
224 whether the variations in the composition of fungal assemblages reflect changes in the  
225 presence-absence of MOTUs, or only changes in their relative abundance.

### 226 *Climatic and weather data*

227 We characterized the local climate and the weather before sampling at each elevation  
228 site (Table 2). Climatic variables representing 30-year-averages were included as potential  
229 descriptors of the suitability of each site for sustaining populations of the different fungal  
230 species. Weather variables describing the temperature and humidity that phyllosphere fungi  
231 actually experienced during their life-time were also included as potential factors influencing  
232 population levels at the sampling date (Bateman et al. 2011).

233 The climate at each site was estimated from the predictions of the AURELHY model  
234 (Analysis Using the Relief for Hydrometeorology, Benichou & Le Breton, 1987) for the  
235 1971-2000 period. The data were supplied by the French National Meteorological Office  
236 (Météo-France). This model can be used to interpolate meteorological records from 65  
237 meteorological stations throughout France to a 1×1 km grid, taking local topography into  
238 account. We retrieved mean temperature, mean precipitation and the mean number of days of  
239 frost for all the sites along the gradient. Data for each variable were available for each season  
240 (winter, spring, summer and autumn).

241 The weather at each site over the days or weeks before sampling was assessed by  
242 taking measurements with four data loggers (HOBO Pro RH/Temp, Onset Computer  
243 Corporation, Bourne, MA). Sensors were installed at a height of 1.5 m above the ground and  
244 were protected under a white plastic shelter to prevent exposure to rain or to direct sunlight.  
245 Air temperature and humidity were recorded hourly from 1 January 2009 to 31 December  
246 2010. All sensors were intercalibrated in the laboratory before installation. We calculated the

247 mean temperature and the standard deviation for temperature at each site over four different  
248 time periods (2, 7, 15 and 30 days) before sampling. We also calculated the mean vapor  
249 pressure deficit (which quantifies the air “dryness”) and the number of hours above the dew  
250 point at each site over the same time periods. We calculated the vapor pressure deficit (vpd)  
251 by subtracting the actual vapor pressure ( $E_s$ , formula 5.13 in Jones, 1992) from the saturation  
252 pressure vapor ( $E_a$ , formula 5.12 in Jones, 1992):

$$253 \quad E_s = 613.75 \times \text{exponential} [17.502 \times \text{Temperature} / (\text{Temperature} + 240.97)]$$

$$254 \quad E_a = \text{relative air humidity} / 100 \times E_s$$

$$255 \quad \text{vpd} = E_a - E_s$$

256 We then calculated the mean of the 10 highest vpd values for the period considered. The  
257 number of hours above the dew point is the number of hours during which the vpd is negative  
258 over the period considered.

### 259 *Statistical analyses*

260 We calculated the compositional dissimilarity matrix between samples, based on the  
261 Canberra index calculated for each of the 30 rarefied datasets. We then calculated the average  
262 dissimilarity matrix from these 30 matrices, to describe the changes in phyllosphere fungal  
263 assemblages among sites without biases due to differences in sample size (sequencing depth).  
264 The Canberra dissimilarity index was selected from a list of possible indices (Bray-Curtis,  
265 Canberra, Manhattan, Kulczynski, Jaccard, Gower, Morisita, Horn) by the *rankindex* function  
266 of the R *vegan* package (Oksanen *et al.*, 2010, R development core team, 2011), which  
267 identified this index as giving the best separation of samples along the elevation gradient. We  
268 also calculated the compositional dissimilarity between samples for the original sample x  
269 MOTU matrix (i.e. the non-rarefied matrix), by using the Chao index (Chao *et al.*, 2005)  
270 implemented in the *vegdist* function of the R *vegan* package, because this index is less  
271 sensitive than others to differences in sample size (Chao *et al.*, 2005). Mean pairwise

272 dissimilarities between samples were represented on a non metric multi-dimensional scaling  
273 (NMDS) plot. NMDS analyses were performed with the *metaMDS* function with default  
274 settings (Oksanen *et al.*, 2010).

275 We then assessed the effect of elevation site on fungal assemblage structure, by  
276 analyzing the average Canberra and Chao dissimilarity matrices in permutational multivariate  
277 analyses of variance (PERMANOVA, Anderson, 2001). These analyses were carried out with  
278 the *adonis* function of the R *vegan* package (Oksanen *et al.*, 2010), with 999 permutations, by  
279 using the three plots per site as replicates. Sampling date and its interaction with site were  
280 also introduced in the analyses of variance, to investigate whether the effect of site was  
281 constant through time.

282 We then investigated the correlations between the dissimilarities of fungal  
283 assemblages and variations of climatic and weather variables. The average Canberra and Chao  
284 dissimilarity matrices were recalculated after summing the sequence data for the three plots  
285 per site, because we had only one climate or weather measure per site. Given the high  
286 dimensionality and collinearity of the environmental dataset (28 climatic and weather  
287 variables), we first selected the season (for each climatic variable) and the period before  
288 sampling (for each weather variable) best correlated with fungal assemblage dissimilarities,  
289 using the BIOENV procedure implemented in the *bioenv* function of the R *vegan* package.  
290 From this reduced dataset, we selected the combination of climatic and weather variables best  
291 correlated with fungal assemblage dissimilarities, by the same procedure. The BIOENV  
292 procedure finds the best subset of environmental variables (by examining all the possible  
293 subsets of variables, from only one variable to all variables), such that the Euclidean distances  
294 of scaled environmental variables have the maximum Pearson correlation with assemblage  
295 dissimilarities (Clarke & Ainsworth, 1993). As geographic distance may also account for the  
296 dissimilarities between fungal assemblages, we added the geographic distance matrix between

297 sites as a partial predictor in the *bioenv* function. We used the *envfit* function of the R *vegan*  
298 package to fit the climatic and weather variables chosen by the BIOENV procedure to the  
299 NMDS, with an identical vector length multiplier factor (option *arrow.mul* of the *envfit*  
300 function), to allow the comparison of environmental vectors between NMDS plots.

301 Finally, we investigated the elevation distribution of the three most abundant  
302 taxonomically assigned MOTUs and the species known to be potentially pathogenic to beech.  
303 These latter species included *Phyllactinia guttata* (powdery mildew), *Neonectria coccinea*  
304 (bark canker), *Mycosphaerella punctiformis* (leaf spot) and *Apiognomonina errabunda*  
305 (anthracnose). The two latter species were shown to be foliar endophytes which can turn into  
306 pathogens under certain conditions (Verkley et al 2004, Bahnweg et al 2005, Unterseher &  
307 Schnittler 2010). We tested the effect of site, sampling date and their interaction by fitting  
308 generalized linear models with a quasi Poisson error distribution and a log link function to the  
309 abundance data (number of sequences assigned to the considered species or order), by using  
310 the *GENMOD* procedure of the SAS/STAT® software (SAS Institute Inc.). The log of the  
311 total number of sequences per sample was included as an offset, to account for differences in  
312 sample size.

## 313 **Results**

314 The dataset comprised 206073 quality sequences distributed into 48 samples (4  
315 sampling dates x 4 elevation sites x 3 plots per site). The mean number of sequences per  
316 sample was 2400 for 2009 (ranging from 755 to 4033) and 6195 for 2010 (ranging from 946  
317 to 20493). The clustering of these sequences, with a threshold of 97% similarity, gave a total  
318 of 3729 MOTUs (Table S2). We identified 12 plant MOTUs, corresponding to 439 sequences  
319 (including 411 sequences from European beech) and four MOTUs that best matched protists  
320 (5 sequences). These MOTUs were removed from the dataset before statistical analyses. The

321 final dataset comprised 3713 fungal MOTUs, including 1662 singletons, which were also  
322 removed before statistical analyses. The mean number of MOTUs per plot was 268 (SD=74)  
323 for 2009 and 360 (SD=165) for 2010. The mean number per elevation site was 546 (SD=107)  
324 for 2009 and 708 (SD=274) for 2010.

325 We were able to assign 367 of the 2051 non-singleton MOTUs to species and 156 to  
326 genera. We were also able to assign 210 of the 1652 singleton MOTUs to species and 90 to  
327 genera (Table S2). The taxonomically assigned MOTUs accounted for 31% of the total  
328 number of sequences. The 577 MOTUs assigned to species corresponded to a total of 335  
329 species, because several MOTUs were assigned to the same species. The number of MOTUs  
330 assigned to the same species was significantly correlated with the number of sequences  
331 assigned to the species concerned ( $R^2 = 0.85$ ,  $P < 0.001$ ). Thus, larger numbers of different  
332 MOTUs were generally identified for the more abundant species.

333 The taxonomically assigned MOTUs were distributed into 50 orders (Table S2). Based  
334 on rarefied datasets, Capnodiales (Ascomycota) and Taphrinales (Ascomycota) were the most  
335 frequently represented orders, accounting each for 36% of the taxonomically assigned  
336 sequences. The next most frequent orders were Dothideales (Ascomycota, 8%), Filobasidiales  
337 (Basidiomycota, 5%), Tremellales (Basidiomycota, 4%), Cystofilobasidiales (Basidiomycota,  
338 3%), Helotiales (Ascomycota, 2%), Pleosporales (Ascomycota, 1%) and Chaetothyriales  
339 (Ascomycota, 1%). Each of the remaining orders accounted for less than 1% of the  
340 taxonomically assigned sequences.

341 Among the 3713 fungal MOTUs, twelve MOTUs each accounted for more than 1% of  
342 the total number of sequences (Table 3). We were able to assign five of these abundant  
343 MOTUs to species, and one to a genus. The three most abundant assigned MOTUs were the  
344 ascomycetous yeast *Taphrina carpini* (6% of the sequences), the ascomycetous black yeast

345 *Venturia hanliniana* (5% of the sequences) and the ascomycetous saprobe *Mycosphaerella*  
346 *flageoletiana* (3% of the sequences). The six MOTUs which could not be taxonomically  
347 assigned matched unidentified environmental sequences obtained either from beech leaf litter  
348 in early decomposition in Austria (Moll *et al.*, unpublished), from beech phyllosphere  
349 sampled in May 2009 in Southern France (Cordier *et al.*, 2012) or from *Quercus macrocarpa*  
350 phyllosphere in the United States (Jumpponen & Jones, 2010).

351 A list of all the MOTUs (singletons and non-singletons), with their abundance and  
352 taxonomic assignment, is available in Table S3. The corresponding sequences are available  
353 under GenBank accession nos. **JN904149** - **JN906968**. These sequences include nSSU and  
354 5.8S in addition to ITS1, whereas the sequences which were used for taxonomic assignment  
355 include ITS1 only. Only the sequences longer than 200 bp are available under GenBank.

356 The NMDS plots show that the composition of fungal assemblages differed  
357 considerably between sites, with dissimilarity increasing with increasing difference in  
358 elevation between sites. They also indicate that the composition of fungal assemblages  
359 differed between the two years of sampling (Figures 1a and 1c). Based on the 30 rarefied  
360 presence-absence datasets, we found that 65% of the non singleton MOTUs were specific to a  
361 particular site whereas 16% of the MOTUs were common to two adjacent sites, both in 2009  
362 and 2010. In 2009, only 6% of the MOTUs were common to all sites (7% in 2010). These  
363 latter MOTUs were very abundant, accounting for 77% of the total number of sequences in  
364 the rarefied datasets. Similar results were obtained with the non-rarefied dataset.

365 The fit of the environmental variables selected by the BIOENV procedure to the  
366 NMDS plots shows that climatic variables, especially temperatures, were the variables best  
367 correlated with fungal assemblage dissimilarities along the gradient of elevation, after the  
368 effect of geographic distance was accounted for. According to the analysis based on the

369 Canberra dissimilarity index (Figure 1b), the average temperature in the spring and the  
370 average number of days of frost during the spring were the variables best accounting for  
371 variations in the composition of phyllosphere fungal assemblages along the gradient of  
372 elevation. The summer precipitations may also account for variations in the composition of  
373 phyllosphere fungal assemblages along the gradient of elevation, but this variable was less  
374 strongly correlated with fungal assemblage dissimilarities ( $R^2=0.28$ ,  $P=0.001$ ) than the  
375 average temperature in the spring ( $R^2=0.98$ ,  $P=0.001$ ) or the number of days of frost during  
376 the spring ( $R^2=0.89$ ,  $P=0.001$ ). According to the analysis based on the Chao dissimilarity  
377 index (Figure 1d), the average temperature in the autumn was the variable best correlated with  
378 fungal assemblage dissimilarities along the gradient ( $R^2=0.95$ ,  $P=0.001$ ). Weather variables  
379 were not correlated with fungal assemblage dissimilarities along the gradient of elevation but  
380 with fungal assemblage dissimilarities among sampling dates (Figures 1b and 1d).

381 Permutational multivariate analyses of variance confirmed the significant effects of  
382 site and sampling date on the composition of phyllosphere fungal assemblages. The effect of  
383 site was significant with both Canberra and Chao dissimilarity indices, and both the  
384 abundance and presence-absence datasets. A significant interaction between site and sampling  
385 date was observed with the Canberra dissimilarity index, but not with the Chao dissimilarity  
386 index (Table 4).

387 Generalized linear models revealed significant site effects for the three most abundant  
388 MOTUs assigned to species (*Taphrina carpini*, *Venturia hanliniana*, *Mycosphaerella*  
389 *flageoletiana*). The interaction between site and sampling date was significant for *T. carpini*  
390 and *V. hanliniana* but not for *M. flageoletiana* (Table 5). This latter species had a significantly  
391 lower abundance at the two highest elevations (Figure 2a). Generalized linear models also  
392 revealed significant site effects for two species described as pathogenic to beech,  
393 *Apiognomonina errabunda* and *Mycosphaerella punctiformis*. For both species, the interaction

394 between site and sampling date was not significant (Table 5). *M. punctiformis* was found  
395 predominantly at the lowest elevation (Figure 2b), whereas *A. errabunda* did not display  
396 monotonous variation in abundance along the gradient in elevation (Figure 2c). The  
397 *GENMOD* procedure did not converge for the two other species potentially pathogenic to  
398 beech (*Phyllactinia guttata* and *Neonectria coccinea*), which had a very low relative  
399 abundance (0.015% and 0.18%, respectively) and were absent from most samples (67% and  
400 73%, respectively).

## 401 **Discussion**

402 Our results show that the composition of fungal assemblages inhabiting the  
403 phyllosphere of European beech (*Fagus sylvatica* L.) varied considerably over a gradient of  
404 1000 m of elevation in the French Pyrénées Mountains. More than 60% of the MOTUs were  
405 specific to a particular elevation site whereas less than 10% of the MOTUs were common to  
406 all sites. The few MOTUs common to all sites were very abundant MOTUs, representing  
407 together more than 75% of the total number of sequences. The ascomycetous yeast *Taphrina*  
408 *carpini*, the ascomycetous black yeast *Venturia hanliniana* and the ascomycetous saprobe  
409 *Mycosphaerella flageoletiana* were the three most abundant and taxonomically assigned  
410 MOTUs. Their abundance varied significantly between elevation sites. Hence, variations in  
411 the composition of phyllosphere fungal assemblages over the gradient of elevation were not  
412 only variations in the presence-absence of the numerous, rare MOTUs but also variations in  
413 the abundance of the few, abundant MOTUs.

414 Our analyses show that climatic variables, representing 30-year-averages (1971-2000),  
415 better accounted for these variations than weather variables, describing temperature and  
416 humidity 2 to 30 days before sampling. Of the climatic variables examined, the mean  
417 temperature in the spring (or in the autumn, depending on the dissimilarity index used in the

418 analysis) and the mean number of days of frost in the spring were the variables best correlated  
419 with fungal assemblage dissimilarities along the gradient of elevation. Our analyses took into  
420 account the geographic distance between sites (26 km between the lowest and highest site) as  
421 a partial predictor of the spatial structure of fungal assemblages along the gradient. In  
422 addition, dispersal constraints over this distance are unlikely to be a strong structuring factor  
423 because many phyllosphere fungi have a high capacity for dispersal and a cosmopolitan  
424 distribution (Levetin & Dorsey, 2006; Helander *et al.*, 2007; Cordier *et al.*, 2012). Our results  
425 therefore confirm that phyllosphere fungal assemblages have a spatial structure despite the  
426 high capacity for dispersal of the species (Jumpponen *et al.*, 2009; Cordier *et al.*, 2012). They  
427 suggest that the spatial structure at the regional scale may be shaped by variations in climate,  
428 especially temperatures.

429         However, several environmental parameters covarying with temperature were not  
430 taken into account in our analyses and may also influence the structure of phyllosphere fungal  
431 assemblages along the studied gradient. First, variations in atmospheric pressure and UV-B  
432 radiation along the gradient of elevation (Körner, 2007) may affect the structure of airborne  
433 and epiphytic fungal assemblages (Marchisio *et al.*, 1997; Newsham *et al.*, 1997; Moody *et*  
434 *al.*, 1999). Second, variation in the composition of the plant community, in terms of the  
435 presence of other trees (*Quercus robur* at the lower sites and *Abies alba* at the upper sites) and  
436 shrubs, may affect the structure of the phyllosphere fungal assemblages of European beech  
437 along the studied gradient, by supplying a habitat for generalist fungal species. We  
438 nevertheless tried to minimize this effect by sampling only forest stands containing more than  
439 50% beech. Third, variation in the functional traits of leaves, controlled by the environment  
440 and the genetic background of the trees, may also structure phyllosphere fungal assemblages  
441 along the gradient of elevation. For example, photosynthetic capacity, leaf mass per unit area,  
442 leaf nitrogen content and leaf wettability vary with elevation (Bresson *et al.*, 2009; Aryal &

443 Neuner, 2010; Bresson *et al.*, 2011). Genetic variation along a gradient of elevation has been  
444 demonstrated for various tree species (review by Ohsawa & Ide, 2008), including European  
445 beech (Löchelt & Franke, 1995; Sander *et al.*, 2000; Jump *et al.*, 2006). Such variation may  
446 influence the structure of associated communities (Bailey *et al.*, 2009), including phyllosphere  
447 fungal assemblages (Cordier *et al.*, 2012).

448         To conclude, our results show that the composition of phyllosphere fungal  
449 assemblages of European beech varied significantly along a steep gradient of elevation, in  
450 terms of both the relative abundance and the presence-absence of species. Variations in  
451 temperature may account for this pattern, although we cannot exclude the influence of other  
452 environmental parameters varying along the gradient and not included in our analyses. We  
453 found that the dominant species, as well as two species described pathogenic to beech, were  
454 unevenly distributed along the gradient of elevation. Therefore, our results suggest that the  
455 composition of phyllosphere fungal assemblages of European beech may change under  
456 climate warming, and that this change may not only affect rare species, but also dominant and  
457 pathogenic species. If the constraints controlling species distributions along the elevation  
458 gradient are mostly abiotic (e.g. temperature, frost), species currently present predominantly  
459 at lower elevations, such as the endophytic latent pathogen *Mycosphaerella punctiformis* (a  
460 causal agent of leaf spots) and the saprobe *Mycosphaerella flageoletiana* (a highly dominant  
461 species), may move upwards as the climate warms up and may alter the functioning of the  
462 beech stands in the upper part of the Pyrénées. If the constraints are also biotic (e.g. presence  
463 of antagonists), species distribution change is more uncertain, because the outcome of biotic  
464 interactions in conditions of global warming is difficult to predict (Tylianakis *et al.*, 2008).

465

466 **Acknowledgments**

467           We thank Sylvain Delzon for providing the weather data along the gradient, and for  
468 his assistance with the calculation of vapor pressure deficit. We also thank Frederick Gavory  
469 and Corinne Cruaud from the Genoscope, Evry, for the 454 sequencing of the samples. We  
470 thank three anonymous reviewers for helpful comments on the first version of the manuscript.  
471 This study was supported by joint grants from the French Ministry of Agriculture, the Forest  
472 Health Department (Convention E17/08, no. 22000285), funding for a European project,  
473 Biodiversity And Climate Change, A Risk Analysis (BACCARA, no 22000325) and a  
474 Genoscope grant (no. 42 AP09/10).

475

476 **Figures and tables**

477

478 **Figure 1** – Phyllosphere fungal assemblage dissimilarity among beech tree plots (n=12)  
479 located along an elevational gradient, represented by non metric multidimensional scaling  
480 (NMDS). Each plot was sampled four times (July and September 2009, June and July 2010).  
481 The NMDS plots represent the average Canberra dissimilarity matrix computed from 30  
482 rarefied quantitative sample x MOTU matrices (a, b) or the Chao dissimilarity matrix  
483 computed from the non-rarefied quantitative sample x MOTU matrix (c and d). In (a) and (c),  
484 the black lines represent elevation and the grey ellipses highlight the year of sampling. In (b)  
485 and (d), the black arrows indicate the environmental factors best correlated with fungal  
486 assemblage dissimilarities whereas the red arrows indicate the direction of the gradient of  
487 elevation and sampling date. The arrow indicating sampling date points toward the end of the  
488 vegetative season (September).

489

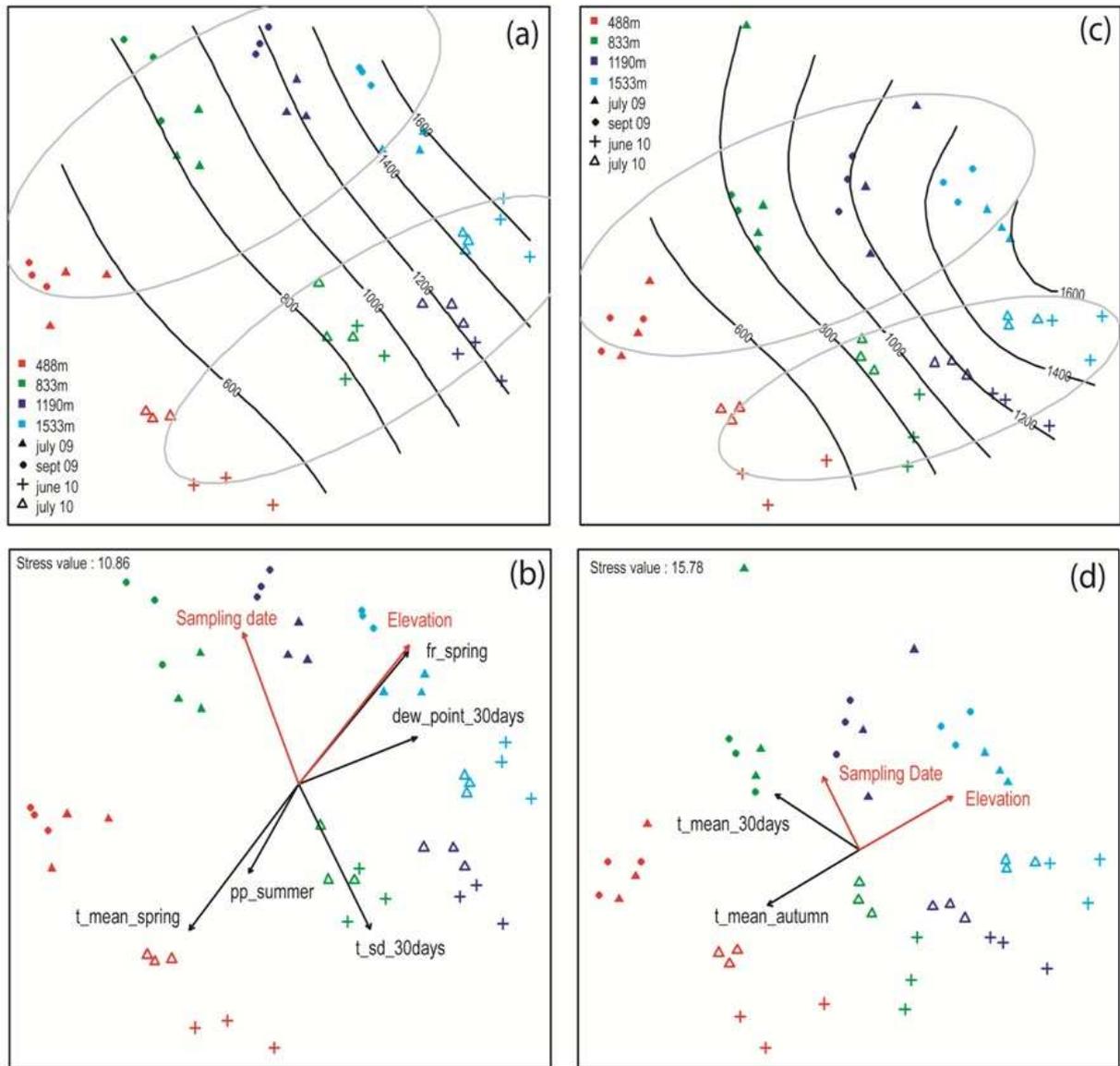
490 **Figure 2** – Relative abundance (number of assigned sequences/total number of sequences of  
491 the sample) of (a) *Mycosphaerella flageoletiana*, (b) *Mycosphaerella punctiformis* and (c)  
492 *Apiognomonia errabunda* as a function of elevation site. The abundance data of the four  
493 sampling dates were pooled since the interactions between sampling date and elevation site  
494 were not significant (Table 5). The red crosses indicate the mean relative abundances and red  
495 letters indicate the results for the tests of differences of least square means.

496

497

498

499



500

501 **Figure 1**

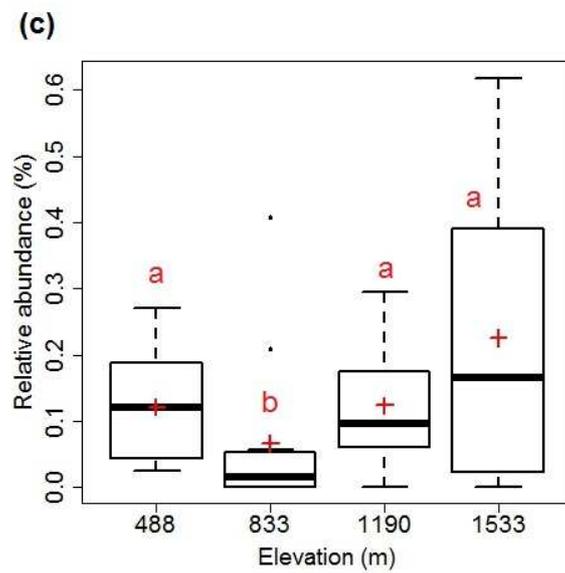
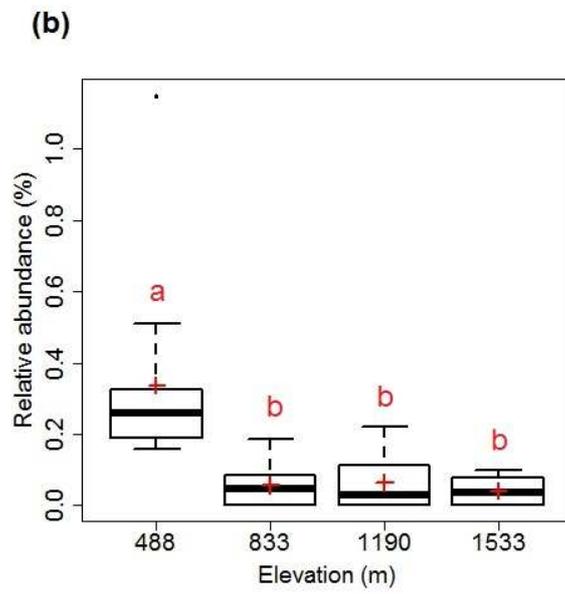
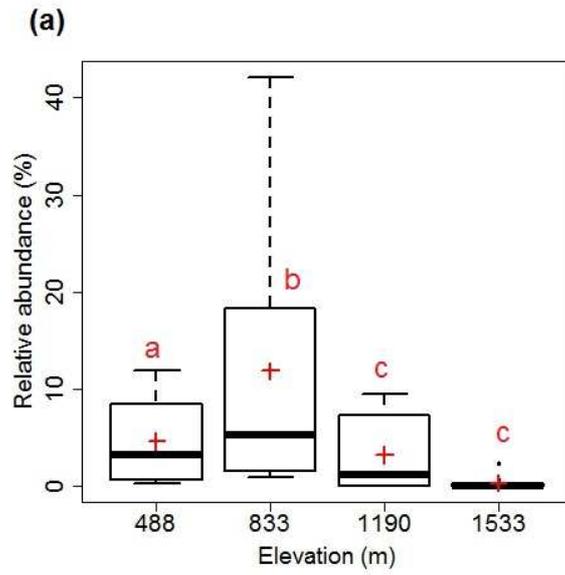
502

503

504

505

506



507 **Figure 2**

**Table 1** - Sampling site characteristics and climatic variables. Average variables were taken from the AURELHY model (1971-2000) and mean annual temperature was obtained with data loggers (standard deviation in brackets). The tree stand at each site consisted of at least 50% European beech.

	Lourdes	Sireix	Haugarou	Lienz
Elevation (m asl)	488	833	1190	1533
Other trees species	<i>Quercus petraea, Sorbus aria</i>	<i>Quercus petraea, Abies alba</i>	<i>Pinus sylvestris, Abies alba</i>	<i>Pinus sylvestris, Abies alba</i>
Latitude	N 43°05'46"	N 42°58'37"	N 43°00'16"	N 42°53'32"
Longitude	W 00°05'14"	W 00°08'29"	W 00°12'49"	E 00°04'24"
Average temp (°C)	12	10.2	8.9	8.1
Average precip (mm)	1504	1306	1508	1406
Mean no. of days of frost	45.1	56.3	69.1	90.1
Mean temp 2009	11.3 (6.5)	10.1 (6.8)	8.1 (7)	6.2 (7.3)
Mean temp 2010	10.4 (7)	9.2 (7.2)	7.2 (7.4)	5.2 (7.5)

**Table 2** - List of climatic and weather variables calculated for each elevation site. The average climatic variables were estimated from the predictions of the AURELHY model (Meteo France) for the 1971-2000 period, whereas the weather variables were measured at each site with temperature and humidity sensors. S indicates the season covered by the climatic variable (winter, spring, summer and autumn), whereas D indicates the number of days before sampling included for calculation of the weather variable (2 days before sampling, 7 days, 15 days or 30 days).

---

Abbreviation	Description
<b><u>Climatic variables</u></b>	
t_mean_S	Mean temperature in season S
pp_S	Mean precipitation in season S
fr_S	Mean no. of days of frost in season S
<b><u>Weather variables</u></b>	
t_mean_D	Mean temperature over the D days before sampling
t_sd_D	Temperature standard deviation over the D days before sampling
dew_point_D	Number of hours above dew point over the D days before sampling
vdp_10max_D	Mean of the ten highest vapor pressure deficit values over the D days before sampling

---

**Table 3** - Taxonomic assignment of the 12 most abundant MOTUs, based on BLAST analysis of MOTU seed sequences against GenBank. Coverage is the percentage of the query length covered by the alignment. Similarity is the percentage identity over the alignment. Closest matches with more than 97% similarity over at least 90% of the query length are shown in bold. The relative abundance of a MOTU is the number of sequences associated with that MOTU over the total number of sequences in the dataset. Source indicates the source of the sequence associated with the underlined accession

GenBank accession no.	MOTU relative abundance	GenBank (environmental sequences excluded)			GenBank (environmental sequences included)			
		Closest match	Similarity / Coverage	Putative taxon	Closest match	Similarity / Coverage	Putative taxon	Source
JN906440	14.38	AY239214	86 / 96	<i>Lalaria inositophila</i>	<b><u>JF495183</u></b>	100 / 100	Uncultured <i>Taphrina</i>	Austria, <i>Fagus sylvatica</i> leaf litter, Moll <i>et al.</i> , unpublished
JN904440	14.34	GQ411291	95 / 100	<i>Articulospora tetracladia</i>	<b><u>JF945438</u></b>	100 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012
JN906683	10.46	AY971723	76 / 94	Fungal sp.	<b><u>JF495199</u></b>	100 / 100	Uncult. Pezizomycotina	Austria, <i>Fagus sylvatica</i> leaf litter, Moll <i>et al.</i> , unpublished
JN905902	6.11	<b><u>AY239215</u></b>	100 / 100	<i>Taphrina carpini</i>	"	"	"	Portugal, <i>Quercus pyrenaica</i> phylloplane, Inácio <i>et al.</i> , 2004
JN905258	5.2	<b><u>AB109183</u></b>	100 / 100	<i>Venturia hanliniana</i>	<b><u>JF945021</u></b>	100 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012
JN904579	3.6	<b><u>EU167597</u></b>	100 / 100	<i>Mycosphaerella flageoletiana</i>	<b><u>JF945447</u></b>	100 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012
JN905085	2.79	AY239214	86 / 96	<i>Lalaria inositophila</i>	<b><u>JF945443</u></b>	99 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012
JN904832	2.56	AY230777	80 / 94	<i>Woollisia</i> mycorrhizal fungus	<b><u>JF946080</u></b>	99 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012
JN905448	1.93	<b><u>HQ909089</u></b>	100 / 100	<i>Aureobasidium pullulans</i>	"	"	"	NA, Li & Yang, unpublished
JN904996	1.46	EU252549	100 / 38	<i>Cryptococcus skinneri</i>	<b><u>GQ508475</u></b>	97 / 100	Uncultured fungus	Kansas, USA, <i>Q. macrocarpa</i> phyllosphere, Jumpponen & Jones, 2010
JN904818	1.14	<b><u>HQ717406</u></b>	100 / 100	<i>Cryptococcus sp.</i>	<b><u>HQ267064</u></b>	100 / 100	Uncultured fungus	Quebec, Maple tree, Filteau <i>et al.</i> , 2011
JN904663	1.03	<b><u>AY808308</u></b>	100 / 100	<i>Dothistroma rhabdoclinis</i>	<b><u>JF945040</u></b>	100 / 100	Uncultured fungus	France, <i>Fagus sylvatica</i> phyllosphere, Cordier <i>et al.</i> , 2012

510

511 **Table 4** - Permutational multivariate analyses of variance of the compositional dissimilarity between  
512 phyllosphere fungal assemblages along an elevation gradient. Canberra index analyses were based on a mean  
513 distance matrix computed from 30 rarefied sample x MOTU matrices. Distances were calculated from  
514 abundance matrices (ab.) or binary matrices (bin.). Chao index analyses were based on the original sample x  
515 MOTU matrix. \*,  $0.01 \leq P < 0.05$ ; \*\*,  $0.001 \leq P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

516

Source	Df	Canberra index (ab.)		Canberra index (bin.)		Chao index	
		SumsOfSqs	Pseudo F	SumsOfSqs	Pseudo F	SumsOfSqs	Pseudo F
Elevation Site	3	2.7848	<b>2.9667***</b>	2.8991	<b>3.7652***</b>	1.21742	<b>35.590***</b>
Sampling Date	3	2.0411	<b>2.1744***</b>	1.7463	<b>2.2679***</b>	0.53370	<b>15.602***</b>
Site x Date	9	3.4795	<b>1.2356***</b>	2.7552	<b>1.1928**</b>	0.02474	0.241
Residuals	32	10.0126		8.2130		0.36487	

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530 **Table 5** - Results for generalized linear models testing the effect of elevation site, sampling date and  
 531 their interaction on the abundance of the three most abundant MOTUs assigned to species (*Taphrina*  
 532 *carpini*, *Venturia hanliniana*, *Mycosphaerella flageoletiana*) and two species potentially pathogenic to  
 533 beech (*Mycosphaerella punctiformis* and *Apiognomonia errabunda*). \*,  $0.01 \leq P < 0.05$ ; \*\*,  $0.001 \leq P$   
 534  $< 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

	Deviance	NumDf	Den Df	F value	Pr > F
<b><i>Taphrina carpini</i></b>					
Elevation Site	3151.32	3	32	30.88	<0.0001***
Sampling Date	1435.99	3	32	27.97	<0.0001***
Date x Site	654.12	9	32	4.25	0.0011**
<b><i>Venturia hanliniana</i></b>					
Elevation Site	6542.9	3	32	38.35	<0.0001***
Sampling Date	1141.86	3	32	149.13	<0.0001***
Date x Site	386.31	9	32	6.95	<0.0001***
<b><i>Mycosphaerella flageoletiana</i></b>					
Elevation Site	12842.6	3	32	79.53	<0.0001***
Sampling Date	995.81	3	32	164.43	<0.0001***
Date x Site	768.51	9	32	1.05	0.423
<b><i>Mycosphaerella punctiformis</i></b>					
Elevation Site	107	3	32	20.96	<0.0001***
Sampling Date	105.2	3	32	0.28	0.8375
Date x Site	68.09	9	32	1.94	0.0818
<b><i>Apiognomonia errabunda</i></b>					
Elevation Site	203.18	3	32	7.77	0.0005***
Sampling Date	123.42	3	32	10.01	<0.0001***
Date x Site	85.03	9	32	1.6	0.156

535

536

537

538 **Supplementary materials**

**Table S1** - 454 pyrosequencing primer sequences used for the amplification of fungal rITS1 and concatemer scheme

Titanium fusion adaptor	5' to 3'
adaptor A	CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAG
adaptor B	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG
ITS1 primers	
ITS2 (forward)	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS1F (reverse)	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
Multiplex tags	
GTATG	GCAGC
GTACT	GCGAT
TCGCA	ACACA
TGATC	AGAGT
ATGCG	CTATA
GCTGT	ACTGA
CACTA	GTAGA
CTAGC	GAGTG
ATCAG	TCTAT
CGACG	AGTGC
ACTAC	TAGCG
GCGCG	TGTAG
Concatemer scheme	
5'- 454 adaptor A + multiplex tag + forward ITS2 -3'	
5'- 454 adaptor B + reverse ITS1F -3'	

539

540

541 **Table S2** – Quantitative sample x MOTU matrix and taxonomic assignment of each MOTU

542 [Supplementary excel file](#)

543 **References**

544 **Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.**  
545 **1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search  
546 programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.

547 **Amend AS, Seifert KA, Bruns Thomas D. 2010.** Quantifying microbial communities with  
548 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**: 5555-5565.

549 **Anderson MJ. 2001.** A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.  
550 *Austral Ecology* **26**: 32-46.

551 **Arnold AE, Mejia LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 2003.**  
552 Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National*  
553 *Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15649-15654.

554 **Aryal B, Neuner G. 2010.** Leaf wettability decreases along an extreme altitudinal gradient.  
555 *Oecologia* **162**: 1-9.

556 **Bahnweg G, Heller W, Stich S, Knappe C, Betz G, Heerdt C, Kehr RD, Ernst D,**  
557 **Langebartels C, Nunn AJ, et al. 2005.** Beech leaf colonization by the endophyte  
558 *Apiognomonia errabunda* dramatically depends on light exposure and climatic conditions.  
559 *Plant Biology* **7**: 659-669.

560 **Bahram M, Pölme S, Kõljalg U, Zarre S, Tedersoo Leho. 2011.** Regional and local  
561 patterns of ectomycorrhizal fungal diversity and community structure along an altitudinal  
562 gradient in the Hyrcanian forests of northern Iran. *New Phytologist*: doi: 10.1111/j.1469-  
563 8137.2011.03927.x.

564 **Bailey JK, Hendry AP, Kinnison MT, Post DM, Palkovacs EP, Pelletier F, Harmon LJ,**  
565 **Schweitzer JA. 2009.** From genes to ecosystems: an emerging synthesis of eco-evolutionary  
566 dynamics. *New Phytologist* **184**: 746-749.

567 **Benichou P, Le Breton O. 1987.** Prise en compte de la topographie pour la cartographie de  
568 champs pluviométriques statistiques. *La Météorologie* **19**: 23-24.

569 **Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH. 2008.** Pathogens promote plant diversity through a  
570 compensatory response. *Ecology Letters* **11**: 461-469.

571 **Bresson CC, Kowalski AS, Kremer A, Delzon S. 2009.** Evidence of altitudinal increase in  
572 photosynthetic capacity: gas exchange measurements at ambient and constant CO<sub>2</sub>  
573 partial pressures. *Ann. For. Sci.* **66**: 505.

574 **Bresson CC, Vitasse Y, Kremer A, Delzon S. 2011.** To what extent is altitudinal variation  
575 of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology*  
576 **doi:10.109.**

577 **Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK,**  
578 **Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. 2010.** QIIME allows analysis of high-  
579 throughput community sequencing data. *Nature Methods* **7**: 335-336.

580 **Chao A, Chazdon RL, Colwell RK, Shen T-J. 2005.** A new statistical approach for  
581 assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. *Ecology*  
582 *Letters* **8**: 148-159.

583 **Clarke KR, Ainsworth M. 1993.** A method of linking multivariate community structure to  
584 environmental variables. *Marine Ecology Progress Series* **92**: 205–219.

585 **Clay K, Holah J. 1999.** Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional  
586 fields. *Science* **285**: 1742-1744.

587 **Cordier T, Robin C, Capdevielle X, Desprez-Loustau M-L, Vacher C. 2012.** Spatial  
588 variability of phyllosphere fungal assemblages: genetic distance predominates over  
589 geographic distance in a European beech stand (*Fagus sylvatica*). *Fungal Ecology*, **in press**  
590 (available online).

591 **Devictor V, Julliard R, Jiguet F, Couvet D. 2008.** Birds are tracking climate warming, but  
592 not fast enough. *Proceedings of the Royal Society of London B* **275**: 2743-2748.

593 **Edgar RC. 2010.** Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.  
594 *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.

595 **Edgar RC. 2011.** Usearch: software and documentation. Version 5.1.  
596 <http://drive5.com/usearch>

597 **Fauth JE, Bernardo J, Camara M, Resetarits Jr. WJ, Buskirk JV, McCollum SA. 1996.**  
598 Simplifying the Jargon of Community Ecology: A Conceptual Approach. *The American*  
599 *Naturalist* **147**: 282-286.

600 **Gange AC, Gange EG, Sparks TH, Boddy L. 2007.** Rapid and Recent Changes in Fungal  
601 Fruiting Patterns. *Science* **316**: 71.

602 **Gardes M, Bruns TD. 1993.** Its Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes -  
603 Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts. *Molecular Ecology* **2**: 113-118.

604 **Gilbert GS. 2002.** Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual*  
605 *Review of Phytopathology* **40**: 13-43.

606 **Hashizume Y, Sahashi N, Fukuda K. 2008.** The influence of altitude on endophytic  
607 mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart . *FOREST*  
608 *PATHOLOGY* **38**: 218-226.

609 **Helander M, Ahlholm J, Sieber TN, Hinneri S, Saikkonen K. 2007.** Fragmented  
610 environment affects birch leaf endophytes. *New Phytologist* **175**: 547-553.

611 **IPCC 2007.** *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working*  
612 *Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*  
613 (S [Solomon D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L.  
614 Miller (eds.)], Ed.). Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge  
615 University Press.

616 **Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca Á, Amaral-Collaço MT, Spencer-Martins I.**  
617 **2002.** Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a  
618 Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* **44**: 344-353.

619 **Jones HG. 1992.** *Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant*  
620 *Physiology* (CU Press, Ed.).

621 **Jump AS, Hunt JM, Penuelas J. 2007.** Climate relationships of growth and establishment  
622 across the altitudinal range of *Fagus sylvatica* in the Montseny Mountains, northeast Spain.  
623 *Ecoscience* **14**: 507-518.

624 **Jumpponen A, Jones KL. 2009.** Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse  
625 fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. *New Phytologist* **184**:  
626 438-448.

627 **Jumpponen A, Jones KL. 2010.** Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus*  
628 *macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist*  
629 **186**: 496-513.

630 **Körner C. 2007.** The use of “altitude” in ecological research. *Trends in ecology & evolution*  
631 **22**: 569-574.

632 **Lenoir J, Gégout, JC, Marquet PA, de Ruffray P, Brisse H. 2008.** A Significant Upward  
633 Shift in Plant Species Optimum Elevation During the 20th Century. *Science* **320**: 1768-1771.

634 **Levetin E, Dorsey K. 2006.** Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia*  
635 **22**: 3-12.

636 **Lindow SE, Brandl MT. 2003.** Microbiology of the phyllosphere. *Applied and*  
637 *Environmental Microbiology* **69**: 1875-1883.

638 **Löchelt S, Franke A. 1995.** Genetic constitution of beech stands (*Fagus sylvatica* L.) along  
639 an altitudinal transect from Freiburg to the top of “Mount Schauinsland.” *Silvae Genetica* **44**:  
640 312–318.

641 **Marchisio VF, Airaudi D, Barchi C. 1997.** One-year monitoring of the airborne fungal  
642 community in a suburb of Turin (Italy) and assessment of its functional relations with the  
643 environment. *Mycological Research* **101**: 821-828.

644 **Meier CL, Rapp J, Bowers Robert M, Silman M, Fierer N. 2010.** Fungal growth on a  
645 common wood substrate across a tropical elevation gradient: Temperature sensitivity,  
646 community composition, and potential for above-ground decomposition. *Soil Biology and*  
647 *Biochemistry* **42**: 1083-1090.

648 **Moody SA, Newsham Kevin K, Ayres PG, Paul ND. 1999.** Variation in the responses of  
649 litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290–315 nm). *Mycological Research* **103**:  
650 1469-1477.

651 **Newsham K K, Low MNR, McLeod AR, Greenslade PD, Emmett BA. 1997.** Ultraviolet-  
652 B Radiation Influences the Abundance and Distribution of Phylloplane Fungi on Pedunculate  
653 Oak (*Quercus robur*). *New Phytologist* **136**: 287-297.

654 **Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ. 2010.** Pathogenesis, parasitism  
655 and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology* **18**:  
656 365-373.

657 **Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH. 2008.** Intraspecific  
658 ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases  
659 and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics Online*  
660 **4**: 193-201.

661 **Nilsson RH, Ryberg M, Abarenkov K, Sjökvist E, Kristiansson E. 2009.** The ITS region  
662 as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing  
663 technologies. *Fems Microbiology Letters* **296**: 97-101.

664 **Nilsson RH, Veldre V, Hartmann M, Unterseher M, Amend A, Bergsten J, Kristiansson**  
665 **E, Ryberg M, Jumpponen A, Abarenkov K. 2010.** An open source software package for  
666 automated extraction of ITS1 and ITS2 from fungal ITS sequences for use in high-throughput  
667 community assays and molecular ecology. *Fungal Ecology* **3**: 284-287.

668 **Ohsawa T, Ide Y. 2008.** Global patterns of genetic variation in plant species along vertical  
669 and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography* **17**: 152-163.

670 **Oksanen JF, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P,**  
671 **Stevens MHM, Wagner H. 2010.** vegan: Community Ecology Package. R package version  
672 1.17-4.

673 **Omacini M, Chaneton EJ, Ghersa CM, Muller CB. 2001.** Symbiotic fungal endophytes  
674 control insect host-parasite interaction webs. *Nature* **409**: 78-81.

675 **Osono T. 2006.** Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer  
676 fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of*  
677 *Microbiology* **52**: 701-716.

678 **Parmesan C. 2006.** Ecological and evolutionary responses to recent climate change. Annual  
679 Review of Ecology Evolution and Systematics. Palo Alto: Annual Reviews, 637-669.

680 **Peñuelas J, Boada M. 2003.** A global change-induced biome shift in the Montseny  
681 mountains (NE Spain). *Global Change Biology* **9**: 131-140.

682 **Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT.**  
683 **2009.** Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature*  
684 *Methods* **6**: 639-U27.

685 **R Development Core Team. 2011.** R: A language and environment for statistical computing.  
686 R Foundation for Statistical Computing. *Vienna, Austria.*

687 **Redford AJ, Bowers R M, Knight R, Linhart Y, Fierer N. 2010.** The ecology of the  
688 phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree  
689 leaves. *Environmental Microbiology* **12**: 2885-2893.

690 **Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez Russell J, Henson JM. 2002.**  
691 Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science* **298**: 1581.

692 **Rodriguez R J, White Jr JF, Arnold AE, Redman R S. 2009.** Fungal endophytes: diversity  
693 and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314-330.

694 **Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA. 2003.** Fingerprints  
695 of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**: 57-60.

696 **SAS Institute Inc., 1997.** SAS/STAT1 software. Release 8.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.

697 **Sander T, König S, Rothe GM, Janßen A, Weisgerber H. 2000.** Genetic variation of  
698 European beech (*Fagus sylvatica* L.) along an altitudinal transect at mount Vogelsberg in  
699 Hesse, Germany. *Molecular Ecology* **9**: 1349-1361.

700 **Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, André Levesque C, Chen W,**  
701 **Fungal Barcoding Consortium. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS)  
702 region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* **109**(16): 6241-6246

703 **Seifert KA. 2009.** Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*  
704 **9**(s1): 83-89.

705 **Sheik CS, Beasley WH, Elshahed MS, Zhou X, Luo Y, Krumholz LR. 2011.** Effect of  
706 warming and drought on grassland microbial communities. *ISME J* **5**: 1692-1700.

707 **Shendure J, Ji H. 2008.** Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**: 1135-  
708 1145.

709 **Suda W, Nagasaki A, Shishido M. 2009.** Powdery Mildew-Infection Changes Bacterial  
710 Community Composition in the Phyllosphere. *Microbes and Environments* **24**: 217-223.

711 **Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC,**  
712 **Erasmus BFN, de Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, et al. 2004.** Extinction risk from  
713 climate change. *Nature* **427**: 145-148.

714 **Tylianakis JM, Didham, R.K., Bascompte, J., Wardle, D.A. 2008.** Global change and  
715 species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**: 1351-1363.

716 **Unterseher M, Jumpponen A, Opik M, Tedersoo L, Moora M, Dormann CF, Schnittler**  
717 **M. 2011.** Species abundance distributions and richness estimations in fungal metagenomics -  
718 lessons learned from community ecology. *Molecular Ecology* **20**: 275-285.

719 **Unterseher M, Schnittler M. 2009.** Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting  
720 endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – Different cultivation techniques influence  
721 fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* **113**: 645-654.

722 **Unterseher M, Schnittler M. 2010.** Species richness analysis and ITS rDNA phylogeny  
723 revealed the majority of cultivable foliar endophytes from beech (*Fagus sylvatica*). *Fungal*  
724 *Ecology* **3**: 366-378.

725 **Verkley GJM, Crous PW, Groenewald JZ, Braun U, Aptroot A. 2004.** *Mycosphaerella*  
726 *punctiformis* revisited: morphology, phylogeny, and epitypification of the type species of the  
727 genus *Mycosphaerella* (Dothideales, Ascomycota). *Mycological Research* **108**: 1271-1282.

728 **White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal  
729 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White  
730 MA, ed. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press,  
731 Inc., 315-322.

732 **Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL. 2000.**  
733 Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte  
734 mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1027-1033.

735 **Yuste JC, Peñuelas J, Estiarte M, Garcia-Mas J, Mattana S, Ogaya R, Pujol M, Sardans**  
736 **J. 2011.** Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to  
737 temperature. *Global Change Biology* **17**: 1475-1486.

738

739

# **Chapitre 3 : Distribution spatiale des principaux champignons pathogènes forestiers en France: recherche de contraintes climatiques, modélisation des effets d'un scénario de changement climatique**

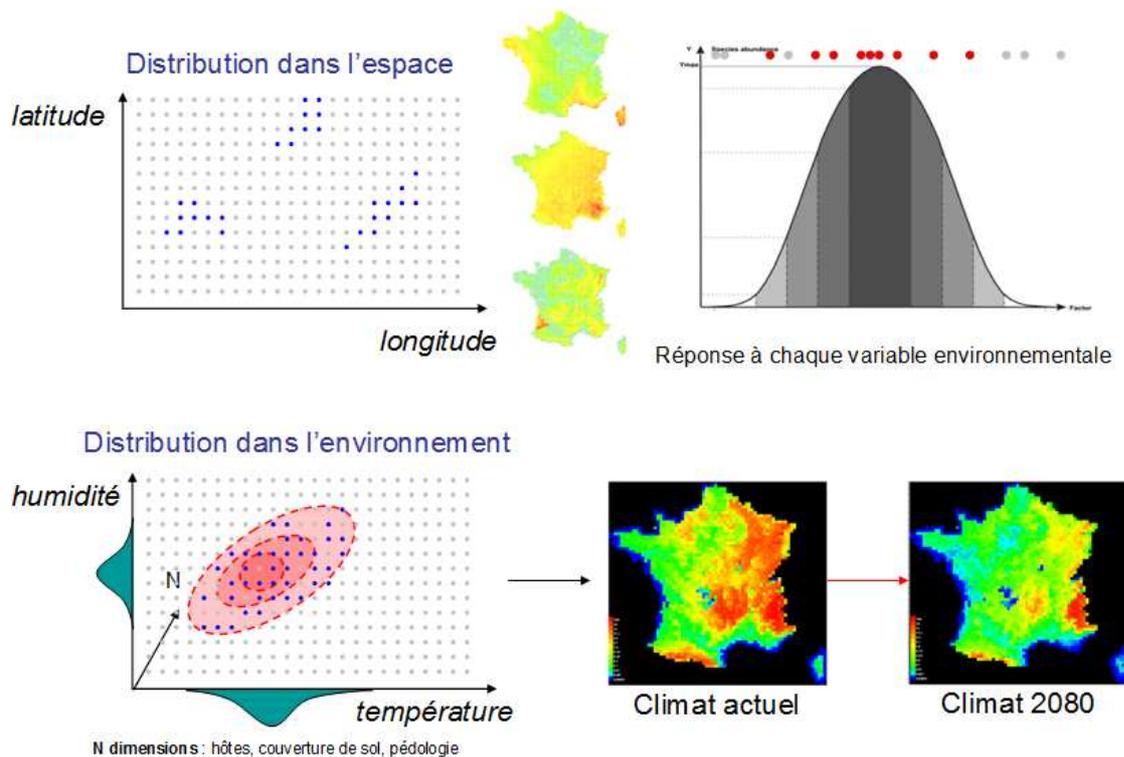
Tristan Cordier, Corinne Vacher, Cécile Robin, Dominique Piou, Marie-Laure Desprez-Loustau

## ***Introduction***

Le changement climatique en cours et prévu a donné un nouvel intérêt et essor aux études de distribution spatio-temporelle des espèces. Dans un environnement changeant, prédire les variations de distribution d'espèces peut être un enjeu important, notamment en termes de gestion. D'autre part, l'évolution récente des techniques statistiques et des systèmes d'information géographique permet d'envisager des modèles de distribution beaucoup plus satisfaisants (Elith & Leathwick 2009). Ces modèles vont d'une part apporter une meilleure compréhension de l'écologie des espèces, d'autre part permettre des prédictions plus fiables.

La niche écologique est un concept central en écologie, elle a été définie comme un volume à  $n$  dimensions, où  $n$  représente idéalement tous les facteurs environnementaux permettant le maintien de populations viables d'une espèce (Hutchinson, 1957). La distribution (ou habitat) d'une espèce en équilibre avec son environnement peut alors être considérée comme la dimension spatio-temporelle de la niche. Les modifications de distributions géographiques en réponse au changement climatique ont d'abord été étudiées chez des animaux supérieurs (Root *et al.* 2003 ; Devictor *et al.* 2008) et des plantes (Peñuelas & Boada, 2003 ; Lenoir *et al.* 2008), avec des approches *a posteriori*, c'est-à-dire en comparant des distributions observées actuelles et passées, par exemple l'optimum d'altitude de présence d'une espèce entre deux périodes. Lorsqu'aucun jeu de données ne permet de faire ce type de comparaison, ou lorsqu'on souhaite pouvoir faire des prédictions, les approches de modélisation s'avèrent indispensables. Les modèles de distribution spatiale, qui mettent en relation des données de présence d'espèces avec des variables environnementales, vont permettre d'estimer une « enveloppe bioclimatique », dans laquelle l'espèce est présumée pouvoir survivre, se développer et se reproduire (Figure 15). A partir de là, on

pourra comparer les distributions prédites sous différents scénarios de conditions environnementales, présentes ou futures. Ce type d'approche est désormais très courant en écologie et biologie de la conservation (Pearson & Dawson, 2003 ; Thuiller *et al.* 2008 ; Elith & Leathwick, 2009) et fait l'objet de nombreuses recherches méthodologiques (Elith *et al.* 2006 ; Araujo & New, 2007 ; Phillips & Dudik, 2008 ; Elith *et al.* 2010 ; Warren & Seifert, 2011).



**Figure 15 : Principe de modélisation de l'enveloppe bioclimatique d'une espèce. A partir de données d'occurrence géo-référencées et de variables environnementales, il est possible de déduire la réponse de l'espèce à chaque variable environnementale (en haut). L'enveloppe bioclimatique d'une espèce correspond à l'ensemble de ces réponses comprises dans un volume à n dimensions, correspondant à n variables. Différentes méthodes permettent de la modéliser. A partir de cette enveloppe, il est possible de déduire une probabilité de présence sur l'ensemble de la grille environnementale, par exemple en testant plusieurs scénarios climatiques (en bas).**

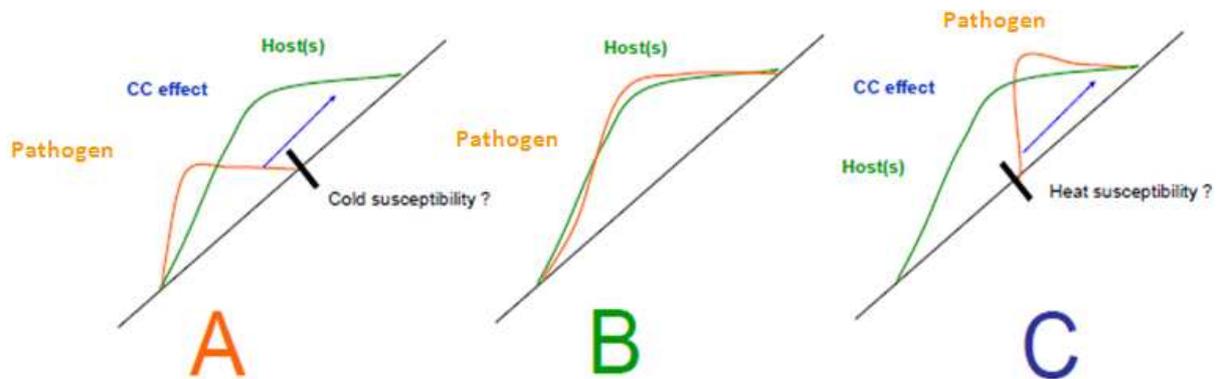
Parmi les méthodes récemment développées, surtout dans un objectif de prédiction, figurent les approches par apprentissage automatique, en particulier les modèles de maximum d'entropie, comme la méthode MaxEnt (Phillips *et al.* 2006). Cette méthode présente des caractéristiques intéressantes par rapport à des modèles de type régression par exemple, en lien avec le type de données généralement utilisées. Elle s'avère particulièrement adaptée à des données de présence seulement (qui sont plus courantes en écologie que les données de présence-absence) et à l'utilisation de nombreuses variables en interaction (Elith *et al.* 2011).

Les approches par apprentissage automatique, en particulier MaxEnt, se sont montrées parmi les plus performantes pour la prédiction (Elith *et al.* 2006 ; Hernandez *et al.* 2006). Leur usage a toutefois pu être limité en écologie du fait de l'approche corrélative ou « boîte noire » pour la prise en compte des variables environnementales dans la probabilité de présence d'une espèce (Elith & Leathwick 2009), contrairement aux modèles mécanistes (Kearney & Porter, 2009).

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la distribution spatiale des principales espèces de champignons pathogènes d'arbres forestiers en France dans l'objectif de réaliser des prédictions sur leur évolution en réponse au changement climatique. La plupart des modèles de niche ou de distributions spatiales ont été utilisés jusqu'à présent pour des espèces dites libres, par opposition aux espèces comme les parasites dont la présence est liée à celle d'une autre espèce (mais voir Reed *et al.* 2008). Un corollaire du mode de vie parasitaire est généralement la petite taille et le manque de visibilité, ce qui fait des parasites un groupe d'organismes encore mal connus et relativement peu intégrés dans les études d'écologie par rapport à leur importance quantitative et fonctionnelle. Ces considérations s'appliquent aux champignons parasites forestiers, dont les données de distribution spatiale sont encore très fragmentaires. Nous disposons toutefois en France d'une base de données relativement exceptionnelle, constituée par le Département Santé des Forêts du Ministère de l'Agriculture depuis la fin des années 1980 (cf matériel et méthodes pour une description plus complète). Ces données ont été partiellement utilisées, pour prédire par exemple l'évolution de la distribution spatiale de quelques parasites comme *Phytophthora cinnamomi* ou *Cryphonectria parasitica* sous l'effet d'un changement climatique (Bergot *et al.* 2004 ; Desprez-Loustau *et al.* 2007) mais pas encore de façon plus générale pour l'ensemble des parasites. Notre démarche est d'utiliser ces données pour 1) tester l'hypothèse que des facteurs climatiques sont des déterminants de la distribution spatiale des espèces pathogènes; 2) essayer de prédire des évolutions attendues sous l'effet d'un scénario de changement climatique.

Pour le premier objectif, l'hypothèse de base est de considérer les différences entre habitat potentiel du parasite, correspondant à l'aire de distribution de son ou ses hôte(s), et habitat observé, correspondant à la fraction de l'aire de distribution de l'hôte effectivement occupée, et de chercher à expliquer ces différences par des variables climatiques. Nous avons développé cette approche à 2 échelles : 1) sur des gradients altitudinaux, correspondant aux 5 principaux massifs montagneux français (Alpes, Pyrénées, Massif central, Vosges, Jura), où nous testons l'hypothèse que les distributions altitudinales de l'hôte et du parasite sont similaires. Si l'hypothèse est rejetée, on peut soupçonner un effet de contraintes thermiques

(figure 16). Ensuite, à l'échelle de la France entière, nous avons utilisé la méthode MaxEnt pour modéliser la distribution spatiale des pathogènes dans l'espace de leur habitat potentiel, en fonction de variables climatiques.



**Figure 16 : Trois patrons de codistribution hôte-pathogène théoriques : en A, l'espèce pathogène n'est mentionnée qu'aux plus basses altitudes de l'aire de distribution de son hôte et pourrait donc être limitée par une contrainte thermique ; en B, l'espèce parasite occupe l'ensemble de l'aire de distribution de l'hôte ; en C, l'espèce parasite est confinée aux plus hautes altitudes de l'aire de distribution de son hôte et pourrait donc être limitée par une contrainte thermique, en sens contraire de A. Sous l'effet d'un réchauffement climatique, en absence de changement de l'aire de l'hôte, les aires des espèces parasites C auront tendance à se réduire, tandis que celles de A pourraient se maintenir voire augmenter.**

Pour le deuxième objectif, nous avons utilisé les modèles obtenus avec MaxEnt (si leur performance était adéquate) pour prédire l'évolution de la distribution des pathogènes sous l'effet d'un scénario de changement climatique choisi parmi ceux considérés comme parmi les plus probables à l'heure actuelle par le Panel Intergouvernemental sur le Changement Climatique (IPCC = GIEC) (McCarthy, 2009).

## **Matériel et méthodes**

### **Données sur les espèces pathogènes**

Nous avons utilisé la base de données du Département de la Santé des Forêt (DSF) du Ministère de l'Agriculture. Cette base de données contient des informations fournies par un réseau de forestiers, dits correspondants-observateurs (CO) formés à l'observation des phénomènes pathologiques et entomologiques et de tous les types de dépérissement des arbres. Les CO signalent les dommages qu'ils ont remarqués au cours de leur travail quotidien dans la forêt, aussi bien publique que privée. Il s'agit donc d'une base de type « épidémiologique », les mentions correspondant à une présence de « symptômes » (plutôt

que d'une espèce), avec implicitement une notion de sévérité (quelques arbres atteints ne seront que rarement mentionnés). La base rassemble environ 55000 fiches de cas géo-référencés (longitude, latitude et pour la plupart l'altitude également) de symptômes de maladies, d'attaques d'insectes, de dégâts abiotiques couvrant 17 années de suivi (1989-2006). Parmi l'ensemble de ces fiches, nous avons retenu uniquement celles pour lesquelles l'agent pathogène (champignon ou *Phytophthora*) avait été identifié au niveau de l'espèce (sur la base des symptômes ou, si nécessaire, par microscopie et isolement par un laboratoire spécialisé, le Laboratoire National de la Protection des Végétaux, Nancy) et dont l'hôte était également identifié au niveau spécifique (soit 12009 fiches). Les fiches ont alors été distribuées en fonction de leurs coordonnées sur le maillage 16x16 km du réseau ICP Forest utilisé pour de nombreuses études spatiales (International Co-operative Programme on Assessment and Monitoring of Air Pollution Effects on Forests, <http://icp-forests.net/>). Pour notre étude, nous nous sommes limités aux espèces pathogènes pour lesquelles nous avons au moins 30 signalements à différentes altitudes dans au moins un massif montagneux pour les codistributions hôte-pathogène, et au moins 30 signalements dans des quadrats 16\*16 km différents pour la modélisation. Nous avons ainsi obtenu 11 espèces pour les codistributions altitudinales, avec 1988 fiches (tous massifs confondus), et 29 espèces pour les modélisations de niche, correspondant à 3876 mentions de pathogènes au total (Tableau 1). Ces 29 espèces correspondent à environ 70% de l'ensemble des mentions de maladie dans la base du DSF (toutes les fiches n'étant pas utilisables en raison de données manquantes sur la localisation ou l'espèce hôte).

## **Données sur les espèces hôtes**

La gamme d'hôtes pour chaque espèce pathogène étudiée a été définie à partir du même jeu de données DSF, en considérant une espèce d'arbre comme hôte si au moins 1% des signalements du champignon pathogène sont réalisés sur cette espèce (Tableau 1).

Pour l'analyse des codistributions hôte-pathogène sur gradients altitudinaux, la distribution de l'hôte (ou des hôtes) pour un pathogène donné a été obtenue en prenant toutes les fiches DSF de l'espèce hôte considérée (ou des espèces hôtes), en retirant celles correspondant au pathogène étudié (par exemple pour l'oïdium du chêne, toutes les fiches mentionnant un problème sur chêne autre que l'oïdium), afin d'avoir 2 distributions indépendantes.

Pour les modélisations de niche à l'échelle de la France, les distributions des 45 espèces hôtes identifiées pour les 29 pathogènes ont été obtenues à partir des données de l'Inventaire Forestier National (IFN) sur des recensements couvrant la période de 1990 à 2000. Ces inventaires donnent pour chaque petite région IFN (zones homogènes du point de vue du type de forêt ou de paysage) une liste d'espèces d'arbres présentes avec pour chacune un indice d'abondance (surface de couverture). La surface par espèce et par petite région IFN a été divisée par le nombre de quadrats 16x16 km couverts par cette région IFN, et la même abondance a été attribuée à chaque quadrat.

Tableau 1 – Espèces pathogènes étudiées

Espèce pathogène	Analyse <sup>a</sup>	Maladie	Hôte principal <sup>b</sup>	Hôtes secondaires et alternants <sup>cd</sup>
<i>Apiognomonina errabunda</i>	CD,M	Anthraxnose (lésions feuilles et rameaux)	<i>Fagus sylvatica</i> (44%)	<i>Acer spp.</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Quercus pubescens</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Quercus rubra</i>
<i>Armillaria gallica</i>	M	Pourridié (racines)	<i>Fagus sylvatica</i> (13%)	<i>Abies grandis</i> , <i>Acer spp.</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Cedrus atlantica</i> , <i>Complex Fraxinus</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Larix kaempferi</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Pinus nigra nigra</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Cultivated poplar</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Quercus robur</i>
<i>Armillaria mellea</i>	M	Pourridié (racines)	<i>Quercus robur</i> (21%)	<i>Abies grandis</i> , <i>Abies nordmanniana</i> , <i>Acer spp.</i> , <i>Alnus glutinosa</i> , <i>Betula pendula</i> , <i>Carpinus betulus</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Cedrus atlantica</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fagus sylvatica</i> , <i>Complex Fraxinus</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Larix kaempferi</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Picea sitchensis</i> , <i>Pinus cembra</i> , <i>Pinus halepensis</i> , <i>Pinus nigra laricio</i> , <i>Pinus nigra nigra</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus pinea</i> , <i>Pinus strobus</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus uncinata</i> , <i>Cultivated poplar</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Quercus ilex</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Quercus pubescens</i> , <i>Quercus pyrenaica</i> , <i>Quercus rubra</i> , <i>Quercus suber</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Thuja plicata</i>
<i>Armillaria ostoyae</i>	M	Pourridié (racines)	<i>Pinus pinaster</i> (20%)	<i>Abies alba</i> , <i>Abies grandis</i> , <i>Cedrus atlantica</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Larix kaempferi</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Picea sitchensis</i> , <i>Pinus halepensis</i> , <i>Pinus nigra laricio</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus uncinata</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	M	Moisissures (parties aériennes)	<i>Cedrus atlantica</i> (14%)	<i>Abies alba</i> , <i>Acer spp.</i> , <i>Complex Fraxinus</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Larix kaempferi</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Pinus nigra laricio</i> , <i>Pinus nigra nigra</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus uncinata</i> , <i>Cultivated poplar</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Pseudotsuga menziesii</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Quercus rubra</i>
<i>Chrysomyxa abietis</i>	M	Rouille d'aiguilles	<i>Picea abies</i> (97%)	<i>Picea sitchensis</i>
<i>Cronartium flaccidum</i>	CD,M	Rouille de troncs	<i>Pinus sylvestris</i> (52%)	<i>Pinus halepensis</i> , <i>Pinus nigra laricio</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus uncinata</i> (hôte alternant = divers espèces herbacées : dompte-venin...)
<i>Cronartium ribicola</i>	M	Rouille de troncs	<i>Pinus strobus</i> (97%)	<i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus sylvestris</i> (hôte alternant = <i>Ribes</i> )
<i>Crumenulopsis sororia</i>	M	Chancre de rameaux et tronc	<i>Pinus halepensis</i> (87%)	<i>Pinus nigra laricio</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Pinus sylvestris</i>

<i>Cryphonectria parasitica</i>	CD, M	Chancre de tronc	<i>Castanea sativa</i> (99%)	
<i>Erysiphe alphitoides</i>	M	Oïdium (feuilles)	<i>Quercus robur</i> (55%)	<i>Fagus sylvatica, Quercus petraea, Quercus pubescens, Quercus pyrenaica, Quercus rubra, Quercus suber</i>
<i>Gymnopus fusipes</i>	M	Pourridié (racines)	<i>Quercus robur</i> (43%)	<i>Castanea sativa, Quercus petraea, Quercus pubescens, Quercus rubra</i>
<i>Heterobasidion annosum</i>	CD, M	Pourridié (racines et tronc)	<i>Picea abies</i> (46%)	<i>Abies grandis, Cedrus atlantica, Fagus sylvatica, Larix decidua, Larix kaempferi, Picea sitchensis, Pinus nigra laricio, Pinus nigra nigra, Pinus pinaster, Pinus pinea, Pinus strobus, Pinus sylvestris, Pseudotsuga menziesii, Tsuga heterophylla</i>
<i>Lachnellula wilkommii</i>	CD	Chancre de rameaux et tronc	<i>Larix decidua</i> (97%)	
<i>Lophodermium piceae</i>	M	Lésions sur aiguilles	<i>Picea abies</i> (94%)	<i>Picea sitchensis</i>
<i>Lophodermium pinastri</i>	M	Lésions sur aiguilles	<i>Pinus sylvestris</i> (50%)	<i>Pinus nigra laricio, Pinus pinaster, Pinus uncinata</i>
<i>Lophodermium seditiosum</i>	M	Lésions sur aiguilles	<i>Pinus nigra laricio</i> (33%)	<i>Pinus nigra laricio, Pinus nigra nigra, Pinus pinaster, Pinus pinea, Pinus strobus, Pinus sylvestris, Pinus uncinata</i>
<i>Melampsora populnea</i>	M	Rouille de tiges et troncs	<i>Pinus pinaster</i> (35%)	<i>Pinus nigra laricio, Pinus sylvestris</i> (hôte alternant = tremble)
<i>Melampsorella caryophyllacearum</i>	CD, M	Rouille –balai de sorcière	<i>Abies alba</i> (97%)	<i>Abies grandis</i> (hôte alternant = <i>Stellaria, Cerastium</i> )

<i>Mycosphaerella pini</i>	CD, M	Lésions aiguilles	<i>Pinus nigra laricio</i> (93%)	<i>Larix decidua, Pinus nigra nigra, Pinus pinaster, Pinus sylvestris, Pinus uncinata</i>
<i>Nectria coccinea</i>	M	Chancre de troncs	<i>Fagus sylvatica</i> (94%)	<i>Acer spp., Quercus petraea</i>
<i>Neonectria ditissima</i>	M	Chancre de troncs	<i>Fagus sylvatica</i> (99%)	<i>Alnus glutinosa</i>
<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>	CD, M	Lésions aiguilles	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (100%)	
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	M	Pourridié (racines)	<i>Picea sitchensis</i> (60%)	<i>Abies grandis, Larix kaempferi, Picea abies, Pinus pinaster, Pinus strobus, Pinus sylvestris, Pseudotsuga menziesii, Quercus ilex, Quercus robur, Tsuga heterophylla</i>
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	M	Nécroses corticales (racines et troncs)	<i>Quercus rubra</i> (53%)	<i>Castanea sativa, Fagus sylvatica, Quercus robur, Quercus rubra, Quercus suber</i>
<i>Pucciniastrum epilobii</i>	CD, M	Rouille d'aiguilles	<i>Abies alba</i> (93%)	<i>Abies grandis</i> (hôte alternant = épilobe)
<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	M	Lésions d'aiguilles	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (71%)	<i>Abies grandis, Picea abies, Picea sitchensis, Pinus sylvestris</i>
<i>Rhizosphaera oudemansii</i>	M	Lésions d'aiguilles	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (85%)	<i>Abies alba, Abies grandis, Picea abies, Pseudotsuga menziesii</i>
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	CD, M	Nécroses sur de nombreux organes	<i>Pinus nigra laricio</i> (38%)	<i>Abies grandis, Cedrus atlantica, Larix decidua, Larix kaempferi, Picea abies, Pinus halepensis, Pinus nigra nigra, Pinus pinaster, Pinus pinea, Pinus strobus, Pinus sylvestris, Pinus uncinata, Pseudotsuga menziesii</i>

<i>Sydowia polyspora</i>	CD, M	Lésions d'aiguilles	<i>Pinus nigra</i> <i>laricio</i> (31%)	<i>Abies grandis, Cedrus atlantica, Larix decidua, Larix kaempferi, Picea abies, Pinus halepensis, Pinus nigra nigra, Pinus pinaster, Pinus pinea, Pinus strobus, Pinus sylvestris, Pinus uncinata, Pseudotsuga menziesii</i>
--------------------------	-------	------------------------	--	---

---

a : CD = co-distribution, M = modélisation

b : hôte principal = sur lequel le pathogène est observé dans la majorité des mentions (le pourcentage est indiqué entre parenthèses)

c : hôtes secondaires : mentions > 1% de l'ensemble des fiches pour l'espèce pathogène

d : les rouilles sont des parasites biotrophes obligatoires qui ont souvent besoin de deux hôtes pour boucler leur cycle de vie ; dans ce cas, l'hôte alternant est indiqué

## Variables climatiques

Des couches climatiques ont été obtenues à partir des données brutes de Worldclim (Hijmans *et al.* 2005, <http://www.worldclim.org/>). Pour les conditions présentes (moyenne sur la période 1950- 2000), les données sont issues d'interpolations à partir de données de plus de 20 000 stations météorologiques couvrant les 5 continents (chiffre exact non disponible pour la France mais environ une cinquantaine). Pour les données futures, le modèle utilisé est le Hadley Centre Coupled Model, version 3 (dit HadCM3). Il s'agit d'un modèle de circulation générale couplé atmosphère-océan, développé au Hadley Centre au Royaume Uni, qui est un des modèles utilisés par l'IPCC. Le scénario d'émission de GES choisi est le scénario A2a et nous avons choisi 2080 comme date pour la prédiction. A cette date, le climat futur ainsi modélisé correspond à une augmentation moyenne de température de 4.5°C et une baisse moyenne des précipitations annuelles de 18 mm par an (contrairement à d'autres scénarios où la quantité annuelle augmente légèrement) (figure 17).

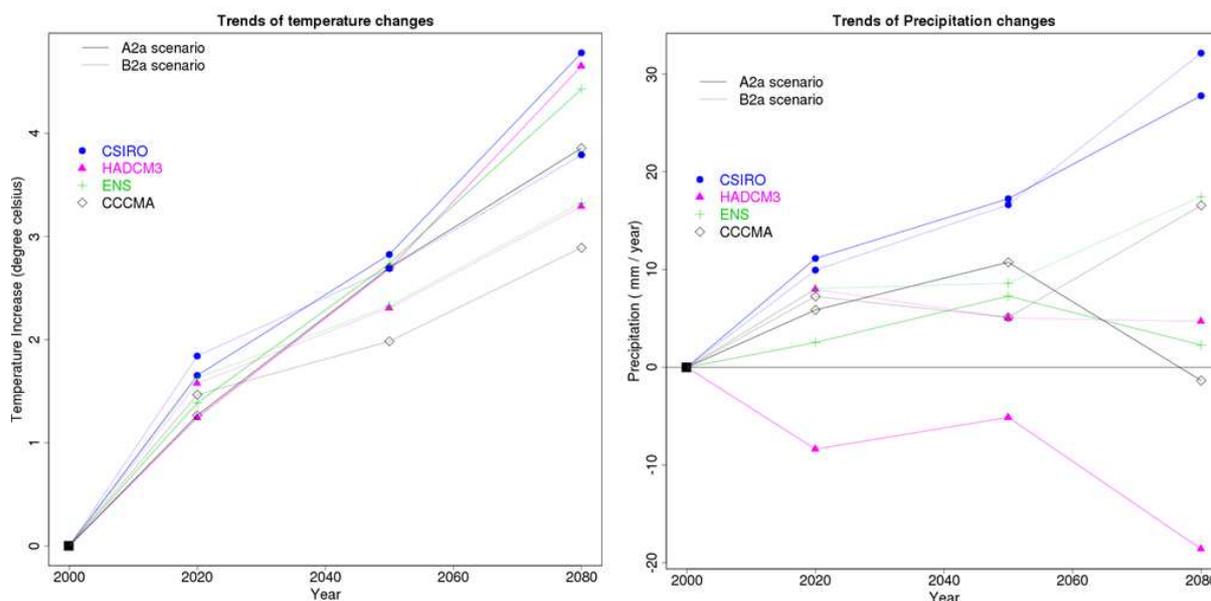


Figure 17 : Augmentation de température et changement des régimes de précipitation simulés par différents modèles de circulation générale en fonction du scénario d'émission des GES (Gaz à Effet de Serre) et en fonction de l'année. (Source : <http://forest.jrc.ec.europa.eu/climate-change/future-trends>)

Les données étant disponibles dans Worldclim à une maille d'environ 1x1 km, nous avons calculé la moyenne de chaque paramètre climatique pour chaque quadrat 16x16 km. A partir des variables actuelles de température minimale et maximale moyenne mensuelle, et de

la précipitation moyenne mensuelle, nous avons généré 19 variables bioclimatiques, en utilisant la fonction *bioclim* du package ‘climates’ sur R (VanDerWal *et al.* unpublished) (Tableau 2). Nous avons ensuite calculé une matrice de corrélation entre ces 19 variables et défini des groupes de variables corrélées, toutes les variables d’un groupe étant corrélées entre elles avec un coefficient de corrélation de Spearman supérieur à 0.5 (ce test non paramétrique ayant été choisi du fait que les données ne suivent pas une distribution normale). Pour éviter d’utiliser des variables redondantes, nous n’avons gardé qu’une variable au sein de chaque groupe pour les modélisations, *a priori* plus intégrative (température moyenne annuelle plutôt que la température moyenne du trimestre le plus froid), ou pour être cohérent sur des périodes (précipitation annuelle plutôt que précipitation du trimestre le plus froid, étant donné que nous avons choisi la moyenne annuelle pour la température).

Table 2 - Liste des variables bioclimatiques et groupe de corrélation. Les variables gardées pour la modélisation sont en gras.

nom variable	Groupe de corrélation	variable
<b>bioclim_01</b>	<b>1</b>	<b>Température moyenne annuelle</b>
bioclim_06	1	Température moyenne du mois le plus froid
bioclim_11	1	Température moyenne du trimestre le plus froid
bioclim_09	1	Température moyenne du trimestre le plus sec
bioclim_03	2	Isothermalité (amplitude thermique moyenne mensuelle / amplitude thermique annuelle)
<b>bioclim_02</b>	<b>2</b>	<b>Moyenne des amplitudes thermiques mensuelles</b>
bioclim_05	3	Température maximale (mois le plus chaud)
<b>bioclim_10</b>	<b>3</b>	<b>Température moyenne du trimestre le plus chaud</b>
<b>bioclim_04</b>	<b>4</b>	<b>Saisonnalité de température (coefficient de variation)</b>
bioclim_07	4	Amplitude annuelle de température
<b>bioclim_08</b>	<b>5</b>	<b>Température moyenne du trimestre le plus humide</b>
<b>bioclim_12</b>	<b>6</b>	<b>Précipitation annuelle</b>
bioclim_13	6	Précipitation du mois le plus humide
bioclim_16	6	Précipitation du trimestre le plus humide
bioclim_19	6	Précipitation du trimestre le plus froid
bioclim_14	7	Précipitation du mois le plus sec
bioclim_17	7	Précipitation du trimestre le plus sec
<b>bioclim_18</b>	<b>7</b>	<b>Précipitation du trimestre le plus chaud</b>
<b>bioclim_15</b>	<b>8</b>	<b>Saisonnalité de précipitation (coefficient de variation)</b>

## **Analyse des co-distributions altitudinales des espèces hôtes et pathogènes**

Nous avons subdivisé l'ensemble des fiches du DSF correspondant aux 11 espèces pathogènes retenues et à leurs arbres-hôtes en 5 sous-ensembles géographiques correspondant aux 5 massifs montagneux français (Vosges, Alpes, Jura, Massif Central, Pyrénées, correspondant à des altitudes de 1 à 2400 m). L'ensemble des fiches, hôtes et pathogènes, ont été classées par ordre d'altitude croissante. Ensuite, un test de Mann-Whitney (non paramétrique) nous a permis de tester si le pathogène est préférentiellement observé dans la partie basse ou haute de la distribution de son hôte, ou s'il couvre l'ensemble de cette distribution. Les tests n'ont été réalisés que lorsque le nombre de fiches hôte et pathogène était supérieurs à 30 dans le massif considéré, ce qui a limité l'analyse à 11 espèces, principalement dans le Massif Central.

## **Modélisation de niche des espèces et évolution des distributions sous un scénario de changement climatique**

Les modèles de niches ont été construits avec le programme MaxEnt (Phillips *et al.* 2006). Ce programme permet de prédire la distribution géographique d'une espèce à partir de données d'occurrence géo-référencées et de couches environnementales. Les données de présence observée et la variation spatiale des couches environnementales dans un espace donné sont utilisées par MaxEnt pour calculer une estimation de la probabilité de présence de l'espèce dans tout point où les variables environnementales sont définies.

Nous avons considéré dans notre étude que l'aire de distribution de l'hôte représentait l'habitat potentiel maximal d'une espèce pathogène, et donc c'est l'espace qui a été utilisé pour modéliser la niche de l'espèce à partir des points de présence observée. Ainsi, seuls les quadrats contenant une des espèces hôtes ont été utilisés pour les modélisations de chacune des espèces pathogènes. Le même espace a été utilisé pour projeter les probabilités de présence pour les 2 périodes, actuelle et en 2080.

Comme peu de critères pour le choix des paramètres et options du programme MaxEnt sont disponibles, nous avons basé nos choix sur les publications récentes utilisant ce programme dans un contexte prédictif (Tableau 3). Les données d'occurrence sont divisées en deux parties, 80% des signalements sont utilisés pour entraîner le modèle, et 20% sont utilisés pour évaluer ce modèle. La probabilité de présence finale de l'espèce est une moyenne des

probabilités sur 100 modélisations indépendantes, avec retraitage aléatoire des données d'entraînement et de test du modèle (option subsample et random seed). La performance de MaxEnt est évaluée grâce à une analyse receiver-operating characteristic (ROC), qui donne une valeur d'aire sous la courbe (AUC) qui permet d'évaluer l'habileté du modèle à prédire correctement la présence de l'espèce. Il est admis qu'une valeur d'AUC en dessous de 0.7 signifie un faible pouvoir prédictif du modèle, une performance modérée entre 0.7 et 0.9 et une haute performance au dessus de 0.9 (Baldwin, 2009). Nous avons augmenté à 5000 le nombre maximal d'itérations pour l'algorithme d'optimisation, car cela augmentait la stabilité des modèles construits (réduction de l'écart type de l'AUC). Si l'AUC moyenne sur les 100 modélisations était supérieure à 0.7, nous avons utilisé la probabilité moyenne de ces 100 modélisations.

MaxEnt fournit des estimations de probabilité de présence de l'espèce allant de 0 à 1 (sortie « logistic » du programme) pour chaque point de l'espace où les variables environnementales sont définies. L'interprétation de ces valeurs en terme de qualité de l'habitat pour l'espèce, par exemple l'usage de seuils pour trancher entre habitat favorable et non favorable, fait l'objet de débats et de recherches méthodologiques (Philips & Dudik, 2008 ; Baldwin, 2009, Anderson & Gonzalez, 2011). Aucun consensus ne semble émerger et les études récentes utilisent différentes options incluses dans MaxEnt soit 'Maximize sensitivity plus specificity' (Fitzpatrick *et al.* 2009), soit '10 percentile training presence' (Jarnevich & Reynolds, 2011) ou alors arbitraire (Klamt *et al.* 2011) (Tableau 3). Dans notre étude, nous avons choisi un seuil arbitraire fixe en définissant l'habitat non favorable par  $P < 0.1$ .

Pour chaque espèce, nous avons réalisé trois cartes (localisation des données d'occurrence, modèle prédictif pour la période 1950-2000 et modèle prédictif pour 2080 avec le scénario de changement climatique. Les cartes ont été réalisées avec la fonction level.plot du package BIOMOD version 1.1-7 (Thuiller, 2003).

Les distributions prédites pour la période actuelle et future ont été comparées pour différents critères : gain ou perte d'habitat favorable ou très favorable, altitude moyenne, altitude et latitude maximale.

Table 3 : Synthèse bibliographique pour le choix des paramètres et options de MaxEnt pour modéliser la niche d'une espèce

Référence	Objectifs de l'étude	Méthode de sélection des variables climatiques à introduire dans le modèle	% du jeu de données utilisé pour tester la qualité du modèle	Critère pour identifier les modèles de bonne qualité	Méthode pour calculer les probabilités de présence	Valeur du paramètre de régulation du sur-ajustement du modèle	Critère(s) pour définir un seuil au dessus duquel l'habitat est favorable
Wollan 2008	<b>Obj1-</b> Identification des variables climatiques responsables de la distribution actuelle d'une espèce	GLM, régression logistique pour identifier les variables qui expliquent le mieux la distribution observée. Ces variables sont ensuite utilisées dans maxent	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné
Fitzpatrick 2008	<b>Obj2-</b> Modélisation du changement de distribution d'une espèce en réponse au changement climatique	Non mentionné	30	AUC test qualité > 0.8	Non mentionné	Non mentionné	"threshold that maximized sensitivity plus specificity under current climate"
Wolfe 2009	<b>Obj3-</b> Modélisation de l'extension de la distribution d'une espèce introduite/invasive	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	« minimum training presence threshold »
Rödder 2009	<b>Obj3</b>	Seules les variables peu corrélées ( <i>a priori</i> ) sont introduites	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné
Rödder 2010	<b>Obj3</b>	Seules les variables peu corrélées sont introduites ( $r^2 < 0.75$ )	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné
Elith 2010	<b>Obj2 et Obj4</b> : test des paramètres et options de MaxEnt, développement méthodologique	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Moyenne de probabilité de 10 simulations. Validation croisée, le jeu de donnée est coupé en 10 sous échantillons, et chaque sous jeu de donnée est utilisé dans une situation pour tester la qualité du modèle	Valeur par défaut (1) ou 2.5	Non mentionné
Jarnevich 2011	<b>Obj3</b>	Idem ( $r^2 < 0.8$ )	30	Non mentionné	Moyenne de probabilité de 25 simulations. Validation croisée	Non mentionné	« 10 percentile training presence threshold »

Kou 2011	<b>Obj2</b>	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné
Poulous 2012	<b>Obj3</b>	Idem ( $r^2 < 0.8$ )	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné
Stohlgren 2010	<b>Obj3</b>	Idem ( $r^2 < 0.8$ )	50	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	“specificity was equal to the sensitivity using test data”
Feeley 2011	<b>Obj4</b>	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	“sum of sensitivity and specificity is maximized”
Rödder 2011	<b>Obj4</b>	Non mentionné	30	Non mentionné	Non mentionné	Non mentionné	“minimum training presence” and “lowest 10th percentile training omission”
Lozier 2011	<b>Obj3</b>	Idem ( $r^2 < 0.8$ )	20	Non mentionné	Moyenne de probabilité de 100 simulations. Sous échantillonnage aléatoire des fiches pour tester le modèle à chaque simulation	Non mentionné	“greater than or equal to the lowest observed for any native range locality were scored as suitable”
Klamt 2011	<b>Obj2</b>	Non mentionné	25	Non mentionné	Une seule mais 1000 itérations (pour l'algorithme d'optimisation)	Non mentionné	Arbitraire >0.5
Fisher 2011	<b>Obj2</b>	Les variables sont choisies <i>a priori</i> par des experts. Puis seules les variables peu corrélées sont introduites ( $r^2 < 0.7$ )	30	Non mentionné	Moyenne de probabilité de 100 simulations. Sous échantillonnage aléatoire. 2000 itérations	Non mentionné	Non mentionné
Paramètre par défaut			0		Une seule modélisation	1	
Notre étude			20	AUC test qualité > 0.7	Moyenne de probabilité de 100 simulations. Sous échantillonnage aléatoire. 5000 itérations	1	Arbitraire >0.1

## Résultats

### Co-distributions hôtes-pathogène sur des gradients altitudinaux

Sur les 10 couples hôte-pathogène étudiés dans le Massif Central, 6 présentent des distributions altitudinales similaires pour les 2 partenaires, résultats confirmés dans les Vosges pour *M. caryophyllacearum* et *H. annosum* (Tableau 4). Toutefois, pour ce dernier, l'analyse dans le Jura donne un résultat différent, avec le pathogène préférentiellement dans la partie haute de la distribution de son hôte. Pour deux couples, les rouilles, *P. epilobi* et *C. flaccidum*, le pathogène est préférentiellement trouvé dans la partie haute de la distribution de son hôte ; ce résultat n'a pas pu être confirmé dans d'autres massifs. Enfin pour les deux derniers couples, le pathogène est préférentiellement trouvé dans la partie basse de la distribution de son hôte, ce qui est confirmé pour *M. pini* dans les Pyrénées mais pas pour *S. sapinea*. *L. wilkommii* n'a pu être analysé que dans les Alpes et montre une préférence pour la partie basse de la distribution de son hôte.

Tableau 4 : Résultats de l'étude de codistributions hôte-pathogène dans les 5 massifs montagneux français (MC : Massif Central ; V : Vosges ; J : Jura ; A : Alpes ; P : Pyrénées). Les fortes probabilités associées au test de Mann-Whitney (en vert) indiquent que les distributions altitudinales de l'hôte et du pathogène ne sont pas significativement différentes, les cases orange correspondent à une distribution du parasite significativement plus basse que celle de son hôte, l'inverse pour les cases bleues

Espèces	Massif	Altitude hôte (min-moy-max)	Altitude pathogène (min-moy-max)	Test Mann-Whitney
<i>Armillaria ostoyae</i>	MC	0 - 730 - 1600	354 - 695 - 1400	0.476
<i>Cronartium flaccidum</i>	MC	0 - 710 - 1378	350 - 840 - 1300	0.008
<i>Cryphonectria parasitica</i>	MC	350 - 547 - 800	310 - 538 - 830	0.959
<i>Heterobasidion annosum</i>	MC	0 - 710 - 1600	270 - 730 - 1400	0.307
	V	200 - 650 - 1200	2 - 630 - 1010	0.5889
	J	250 - 750 - 1250	210 - 850 - 963	0.0411
<i>Lachnellula willkommii</i>	A	300 - 1700 - 2400	950 - 1430 - 1950	0.005
<i>Melampsorella caryophyllacearum</i>	MC	1 - 900 - 1450	450 - 835 - 1200	0.188
	V	230 - 630 - 1020	370 - 630 - 1000	0.4042
<i>Mycosphaerella pini</i>	MC	200 - 735 - 1420	420 - 600 - 990	0.02
	P	3 - 560 - 1440	280 - 500 - 1490	0.002
<i>Phaeocryptopus gaumannii</i>	MC	220 - 650 - 1300	49 - 660 - 1060	0.615
	P	400 - 760 - 1400	400 - 900 - 1200	0.9
<i>Pucciniastrum epilobii</i>	MC	70 - 850 - 1450	1 - 1200 - 1400	0
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	MC	0 - 700 - 1970	130 - 620 - 1378	0.006
	P	3 - 684.5 - 2200	280 - 521 - 1800	0.3151
<i>Sydowia polyspora</i>	MC	0 - 697 - 1420	340 - 768 - 1970	0.145

## Modélisations de niche

Parmi les 29 espèces étudiées, 19 ont une valeur moyenne d'AUC supérieure à 0.7, indiquant un modèle de niche satisfaisant (Tableau 5). On observe une corrélation négative significative entre le pourcentage d'occupation de la couche hôte et la valeur d'AUC ( $r=-0.59$ ,  $P = 0.001$ ). En particulier, un modèle satisfaisant ne peut être obtenu pour les espèces les plus largement distribuées par rapport à leurs hôtes, comme *C. parasitica*, agent du chancre du châtaignier (32% des quadrats hôtes), *P. gaumanii*, agent de la rouille suisse du Douglas (25%) , et *Sphaeropsis sapinea*, pathogène sur pins (25%), ainsi que *E. alphitoides*, agent de l'oïdium du chêne (18%).

Pour 18 des 19 espèces, le modèle de niche utilise des variables liées d'une part à la température, en particulier température annuelle moyenne et saisonnalité, d'autre part aux précipitations, en particulier précipitations du trimestre le plus chaud et saisonnalité (Tableau 6). *P. cinnamomi* est la seule espèce pour laquelle uniquement des variables de températures sont sélectionnées. La variable « précipitations du trimestre le plus chaud » apparaît comme globalement la plus influente, par sa fréquence de sélection, son ordre de sélection, et sa contribution (Tableau 6).

## Changements de distributions prédites associés au changement climatique

Sous l'hypothèse considérée ici d'une constance de l'habitat potentiel (la distribution actuelle de l'hôte est utilisée comme espace de projection aux 2 dates), 18 des 19 espèces pour lesquelles le modèle MaxEnt est satisfaisant sont prédites pour perdre une partie de leur habitat sous le scénario de changement climatique testé, à l'horizon 2080 (Tableau 7 et Figure 5). Les contractions d'habitat sont très importantes, de 50 000 à 440 000 km<sup>2</sup> de surface en moins, soit 10 à 100 % de la surface actuelle occupée. Six espèces sont même prédites pour s'éteindre en France, c'est-à-dire qu'aucun point ne reste associé à une probabilité de présence supérieure à 0.1 (*Gymnopus fusipes*, *Rhizosphaera kalkhoffii*, *Mycosphaerella pini*, *Neonectria ditissima*, *Phytophthora cinnamomi* et *Lophodermium piceae*). Très peu d'espèces conservent des zones à probabilité de présence élevée : *A. mellea* (max= 0.67), *C. flaccidum* (max=0.74), *M. populnea* (max=0.63), *C. sororia* (max= 0.93). Une augmentation de zone favorable n'est observée que pour cette dernière espèce, agent de chancre sur pins, en particulier pin d'Alep en région méditerranéenne.

Tableau 5 - Résultats des modélisations de niche avec les conditions climatiques actuelles, et les quatre variables les plus explicatives (et leur contribution en %). Les espèces pour lesquelles le modèle est satisfaisant sont en gras.

Espèces	Nombre de fiches	Espace hôte (nombre quadrats)	% occupation de l'espace hôte	AUC_test MaxEnt	Surface habitable (en km <sup>2</sup> )	Latitude moyenne (Lambert II étendu)	Altitude moyenne (m)	Première variable	Deuxième variable	Troisième variable	Quatrième variable
<i>Apiognomonina errabunda</i>	51	2161	2.4	0.684	511232	2190942	341	bioclim_4_46	bioclim_18_17.2	bioclim_1_12.4	bioclim_8_10.7
<b><i>Armillaria gallica</i></b>	<b>63</b>	<b>2191</b>	<b>2.9</b>	<b>0.795</b>	<b>433920</b>	<b>2226689</b>	<b>346</b>	<b>bioclim_4_25.6</b>	<b>bioclim_18_19.8</b>	<b>bioclim_1_19.4</b>	<b>bioclim_15_13.4</b>
<b><i>Armillaria mellea</i></b>	<b>67</b>	<b>2241</b>	<b>3.0</b>	<b>0.702</b>	<b>523264</b>	<b>2175747</b>	<b>337</b>	<b>bioclim_18_30.1</b>	<b>bioclim_1_14.4</b>	<b>bioclim_4_14.1</b>	<b>bioclim_15_13.5</b>
<i>Armillaria ostoyae</i>	101	1866	5.4	0.679	193792	1013417	274	bioclim_18_30.7	bioclim_15_21.5	bioclim_1_15.2	bioclim_10_12.6
<i>Botrytis cinerea</i>	105	2221	4.7	0.668	542976	2126636	441	bioclim_12_31.1	bioclim_1_21.5	bioclim_4_14.5	bioclim_18_13.3
<b><i>Chrysomyxa abietis</i></b>	<b>32</b>	<b>832</b>	<b>3.8</b>	<b>0.769</b>	<b>131840</b>	<b>2154334</b>	<b>835</b>	<b>bioclim_18_54.4</b>	<b>bioclim_12_27.5</b>	<b>bioclim_15_6.5</b>	<b>bioclim_4_3.3</b>
<b><i>Cronartium flaccidum</i></b>	<b>83</b>	<b>1557</b>	<b>5.3</b>	<b>0.765</b>	<b>331008</b>	<b>2114836</b>	<b>443</b>	<b>bioclim_15_34.5</b>	<b>bioclim_8_29.4</b>	<b>bioclim_1_12.7</b>	<b>bioclim_10_9</b>
<b><i>Cronartium ribicola</i></b>	<b>40</b>	<b>1462</b>	<b>2.7</b>	<b>0.776</b>	<b>268800</b>	<b>2191315</b>	<b>399</b>	<b>bioclim_18_38</b>	<b>bioclim_4_28</b>	<b>bioclim_1_14.6</b>	<b>bioclim_15_7.7</b>
<b><i>Crumenulopsis sororia</i></b>	<b>53</b>	<b>1554</b>	<b>3.4</b>	<b>0.918</b>	<b>68096</b>	<b>1959964</b>	<b>258</b>	<b>bioclim_18_47.1</b>	<b>bioclim_15_22.7</b>	<b>bioclim_10_12.6</b>	<b>bioclim_2_11.8</b>
<i>Cryphonectria parasitica</i>	283	877	32.3	0.558	224512	2085567	334	bioclim_2_32.2	bioclim_4_19.3	bioclim_12_13.8	bioclim_18_12.1
<i>Erysiphe alphitoides</i>	383	2181	17.6	0.681	501248	2202943	265	bioclim_18_23.6	bioclim_10_20.7	bioclim_15_19.6	bioclim_1_14.4
<b><i>Gymnopus fusipes</i></b>	<b>143</b>	<b>2123</b>	<b>6.7</b>	<b>0.733</b>	<b>401920</b>	<b>2187534</b>	<b>252</b>	<b>bioclim_2_25.4</b>	<b>bioclim_18_23.9</b>	<b>bioclim_10_17.2</b>	<b>bioclim_1_8.2</b>
<b><i>Heterobasidion annosum</i></b>	<b>419</b>	<b>1963</b>	<b>21.3</b>	<b>0.728</b>	<b>414720</b>	<b>2150277</b>	<b>434</b>	<b>bioclim_18_61.7</b>	<b>bioclim_4_8.4</b>	<b>bioclim_12_8.4</b>	<b>bioclim_15_6.2</b>
<b><i>Lophodermium piceae</i></b>	<b>33</b>	<b>832</b>	<b>4.0</b>	<b>0.799</b>	<b>153856</b>	<b>2266701</b>	<b>512</b>	<b>bioclim_2_46.5</b>	<b>bioclim_18_24.6</b>	<b>bioclim_10_10.6</b>	<b>bioclim_8_6.4</b>
<i>Lophodermium pinastri</i>	41	1519	2.7	0.657	380928	2177788	386	bioclim_15_48.7	bioclim_4_15.3	bioclim_2_9.6	bioclim_18_9.2
<b><i>Lophodermium seditiosum</i></b>	<b>63</b>	<b>1550</b>	<b>4.1</b>	<b>0.71</b>	<b>361984</b>	<b>2130428</b>	<b>372</b>	<b>bioclim_2_35.8</b>	<b>bioclim_18_23.8</b>	<b>bioclim_4_15.2</b>	<b>bioclim_1_9.7</b>
<b><i>Melampsora populnea</i></b>	<b>159</b>	<b>1516</b>	<b>10.5</b>	<b>0.737</b>	<b>326912</b>	<b>2161015</b>	<b>237</b>	<b>bioclim_8_32.9</b>	<b>bioclim_1_22.3</b>	<b>bioclim_15_17.5</b>	<b>bioclim_4_9.6</b>
<i>Melampsorella caryophyllacearum</i>	72	511	14.1	0.643	127232	2081163	846	bioclim_8_26.9	bioclim_4_25.3	bioclim_15_16.7	bioclim_18_10.6
<b><i>Mycosphaerella pini</i></b>	<b>235</b>	<b>1551</b>	<b>15.2</b>	<b>0.741</b>	<b>311040</b>	<b>2163190</b>	<b>269</b>	<b>bioclim_4_32.1</b>	<b>bioclim_1_23.8</b>	<b>bioclim_12_13.5</b>	<b>bioclim_18_11.1</b>
<b><i>Nectria coccinea</i></b>	<b>66</b>	<b>1876</b>	<b>3.5</b>	<b>0.831</b>	<b>333312</b>	<b>2311184</b>	<b>335</b>	<b>bioclim_1_35.4</b>	<b>bioclim_2_23.2</b>	<b>bioclim_4_23.1</b>	<b>bioclim_15_5.8</b>
<b><i>Neonectria ditissima</i></b>	<b>155</b>	<b>1255</b>	<b>12.4</b>	<b>0.734</b>	<b>266752</b>	<b>2271195</b>	<b>372</b>	<b>bioclim_10_19.4</b>	<b>bioclim_1_18.3</b>	<b>bioclim_8_17</b>	<b>bioclim_12_15.2</b>
<i>Phaeocryptopus gaeumannii</i>	176	707	24.9	0.648	173312	2162806	420	bioclim_18_37.4	bioclim_12_14.4	bioclim_4_13.7	bioclim_2_8.9
<b><i>Phaeolus schweinitzii</i></b>	<b>62</b>	<b>2236</b>	<b>2.8</b>	<b>0.803</b>	<b>359424</b>	<b>2270345</b>	<b>378</b>	<b>bioclim_4_71</b>	<b>bioclim_10_10.9</b>	<b>bioclim_18_5.5</b>	<b>bioclim_8_5.2</b>
<b><i>Phytophthora cinnamomi</i></b>	<b>101</b>	<b>2102</b>	<b>4.8</b>	<b>0.87</b>	<b>237824</b>	<b>2087507</b>	<b>186</b>	<b>bioclim_2_36.8</b>	<b>bioclim_4_25.9</b>	<b>bioclim_1_24.8</b>	<b>bioclim_8_3.6</b>
<b><i>Pucciniastrum epilobii</i></b>	<b>58</b>	<b>511</b>	<b>11.4</b>	<b>0.737</b>	<b>121344</b>	<b>2038304</b>	<b>936</b>	<b>bioclim_8_32.3</b>	<b>bioclim_1_26.6</b>	<b>bioclim_4_24.1</b>	<b>bioclim_15_8.1</b>
<b><i>Rhizosphaera kalkhoffii</i></b>	<b>86</b>	<b>1491</b>	<b>5.8</b>	<b>0.746</b>	<b>329728</b>	<b>2208624</b>	<b>485</b>	<b>bioclim_18_51</b>	<b>bioclim_4_11.7</b>	<b>bioclim_12_9.1</b>	<b>bioclim_1_9</b>
<b><i>Rhizosphaera oudemansii</i></b>	<b>73</b>	<b>1096</b>	<b>6.7</b>	<b>0.702</b>	<b>250112</b>	<b>2193999</b>	<b>491</b>	<b>bioclim_18_39.6</b>	<b>bioclim_4_23.3</b>	<b>bioclim_10_17.3</b>	<b>bioclim_15_10.9</b>
<i>Sphaeropsis sapinea</i>	458	1829	25.0	0.635	276480	1251568	259	bioclim_4_26.3	bioclim_10_18.5	bioclim_18_15.3	bioclim_2_14.8
<i>Sydowia polyspora</i>	215	1858	11.6	0.624	461824	2172225	395	bioclim_4_33.4	bioclim_18_23	bioclim_8_13.7	bioclim_12_13.2

Tableau 6 : Importance des variables bioclimatiques dans les modèles sélectionnés (AUC &gt; 0.7)

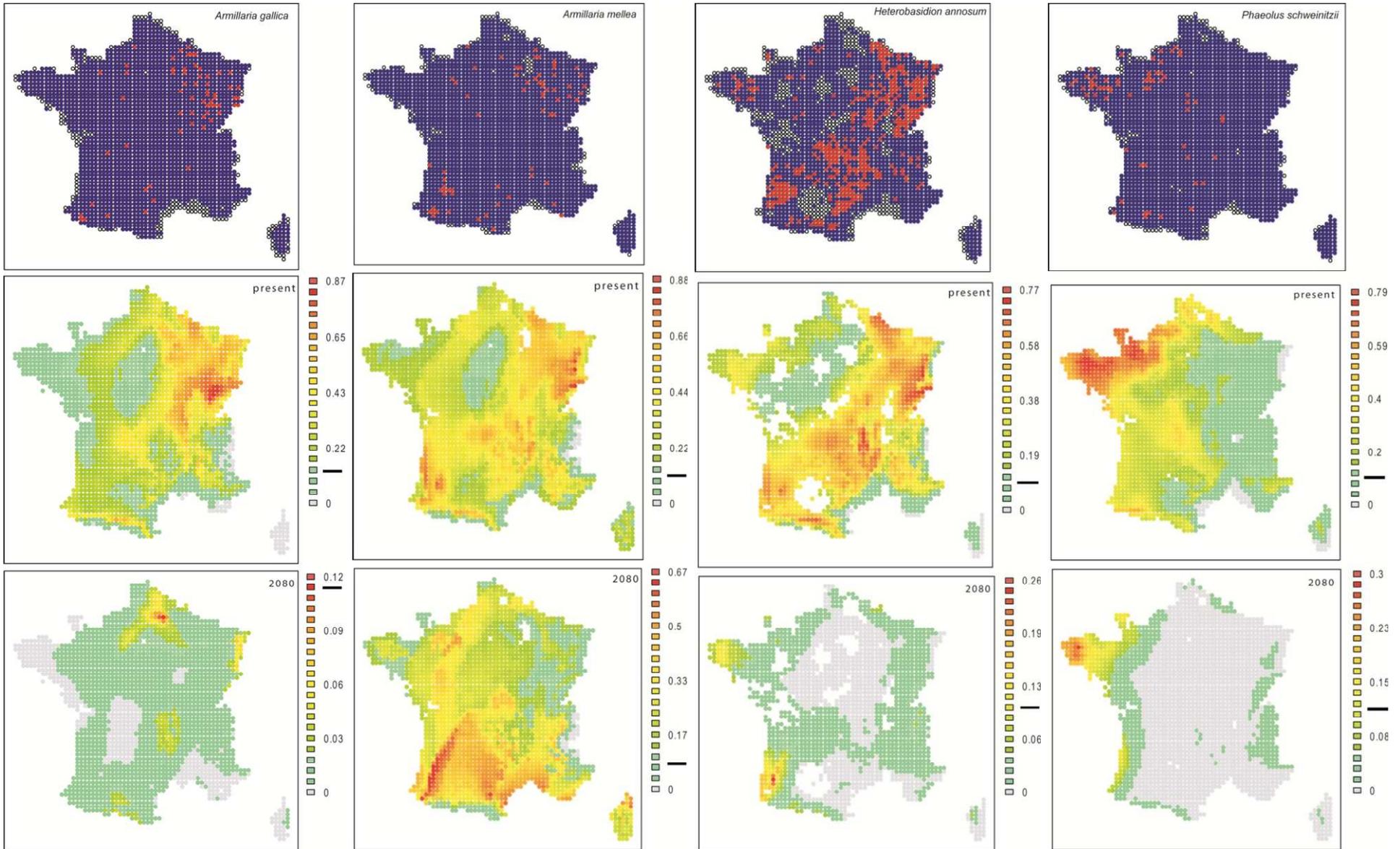
variable	Signification	Nombre d'espèces où la variable est sélectionnée sur 19 (en 1er)	Ordre moyen de sélection (entre 1 et 4)	Contribution moyenne (%)
bioclim_1	<b>Température moyenne annuelle</b>	13 (1)	2.7	18.4
bioclim_2	<b>Moyenne des amplitudes thermiques mensuelles</b>	6 (4)	1.7	29.9
bioclim_4	<b>Saisonnalité de température (coefficient de variation thermique)</b>	14 (3)	2.4	22.5
bioclim_8	<b>Température moyenne du trimestre le plus humide</b>	7 (2)	2.7	18.1
bioclim_10	<b>Température moyenne du trimestre le plus chaud</b>	7 (1)	2.7	13.9
bioclim_12	<b>Précipitation annuelle</b>	5 (0)	3	14.7
bioclim_15	<b>Saisonnalité de précipitation (coefficient de variation)</b>	11 (1)	3.4	13.3
bioclim_18	<b>Précipitation du trimestre le plus chaud</b>	13 (7)	1.7	33.1

Tableau 7 - Changement de niche prédit après changement climatique. Les deux dernières colonnes indiquent le nombre de quadrats avec une probabilité de présence supérieure à 0.1, seuil à partir duquel nous considérons l'habitat comme favorable.

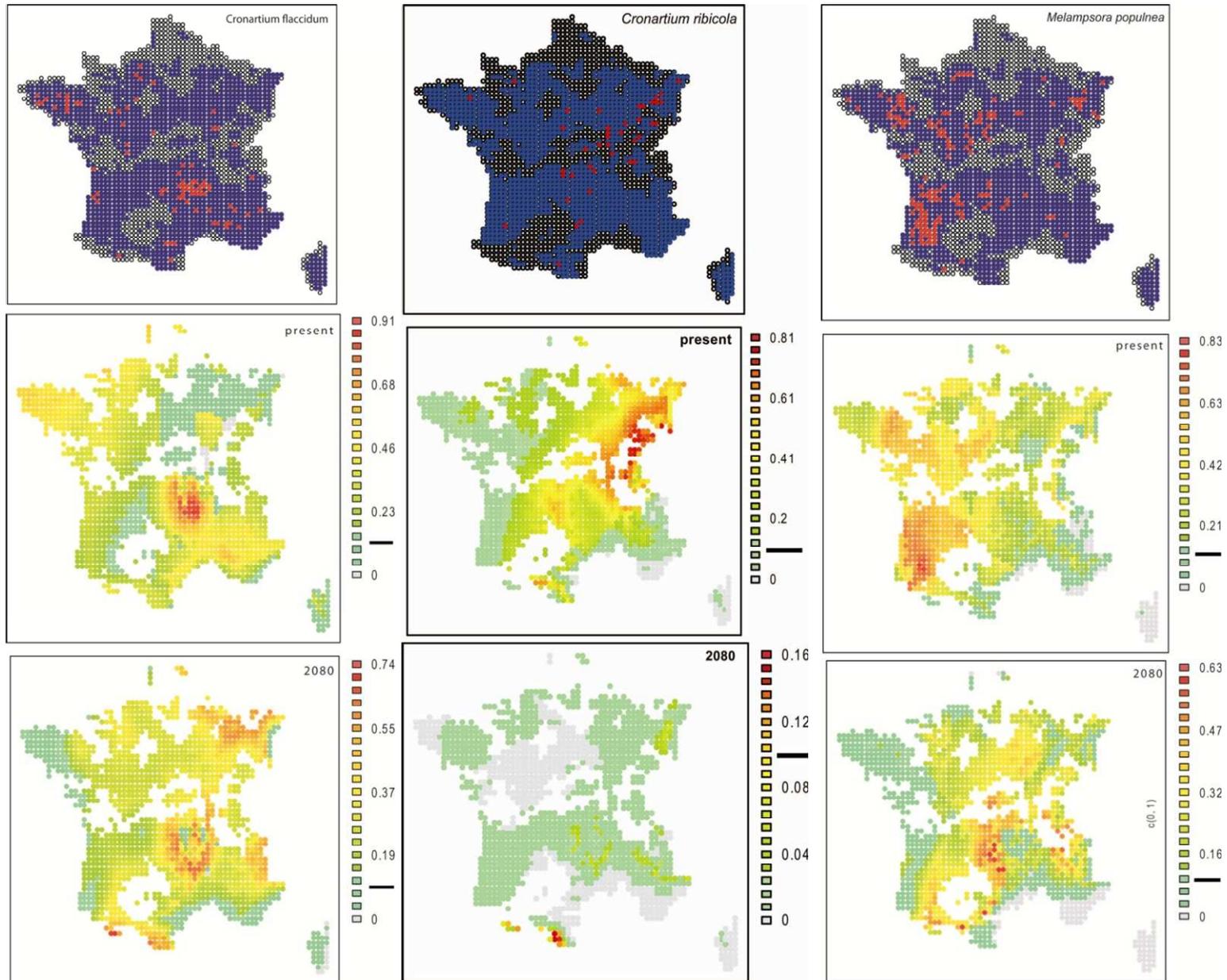
Espèces	Différence d'habitat favorable (en %)	Décalage latitude maximale	Décalage altitude maximale (m)	Décalage latitude moyenne	Décalage altitude moyenne (m)	Nombre de quadrats avec P> 0.1 actuel	Nombre de quadrats avec P> 0.1 futur
<i>Armillaria gallica</i>	-99.9	-144000	-1527	+63232	-5	1695	2
<i>Armillaria mellea</i>	-10	-16000	-98	-66872	-56	2044	1839
<i>Chrysomyxa abietis</i>	-98.6	-480000	0	-51140	+658	515	7
<i>Cronartium flaccidum</i>	+6.3	0	0	+34802	+57	1293	1375
<i>Cronartium ribicola</i>	-99.2	-848000	+144	-101185	+430	1050	8
<i>Crumenulopsis sororia</i>	+451.9	+192000	+1259	+220601	+136	266	1468
<i>Gymnopus fusipes</i>	-100	-2652000	-1033	-74957	-5	1570	0
<i>Heterobasidium annosum</i>	-96.7	-224000	-1371	-44556	-54	1620	53
<i>Lophodermium piceae</i>	-100	-2588000	-1847	-67408	+602	601	0
<i>Lophodermium seditiosum</i>	-96.5	-176000	-2434	+8707	-220	1414	49
<i>Melampsora populnea</i>	-24.7	-16000	+888	-23312	+195	1277	961
<i>Mycosphaerella pini</i>	-100	-2620000	-1827	+66318	+343	1215	0
<i>Nectria coccinea</i>	-82.5	-304000	+940	-136273	+650	1302	228
<i>Neonectria ditissima</i>	-100	-2652000	-1609	+96	+106	1042	0
<i>Phaeolus schweinitzii</i>	-92.9	-128000	-2186	+62219	-92	1404	100
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	-100	-2604000	-891	+154864	-51	929	0
<i>Pucciniastrum epilobii</i>	-94.5	0	-1433	+109967	-288	474	26
<i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	-100	-2620000	-2430	+144504	-328	1288	0
<i>Rhizosphaera oudemansii</i>	-99.9	-64000	-1915	+132614	-177	977	1

Figure 4 : Cartes issues des modélisations de niches sous le climat actuel et sous un scénario de changement climatique. Pour chaque espèce, trois cartes ont été réalisées, une représentant les données d'occurrence dans la base DSF, une autre représentant la probabilité de présence dans l'ensemble de l'espace potentiel (la distribution du ou des hôtes) sous le climat actuel et enfin une dernière représentant la probabilité de présence de l'espèce sous un scénario de changement climatique. A noter que les codes-couleurs des cartes ne sont pas identiques, il convient de regarder l'échelle de probabilité pour interpréter les cartes. Une barre noire sur chaque échelle indique approximativement le seuil de probabilité à partir duquel l'habitat est considéré comme favorable. Pour les espèces où le modèle de niche a une  $AUC < 0.7$ , seules les cartes d'observations sont présentées.

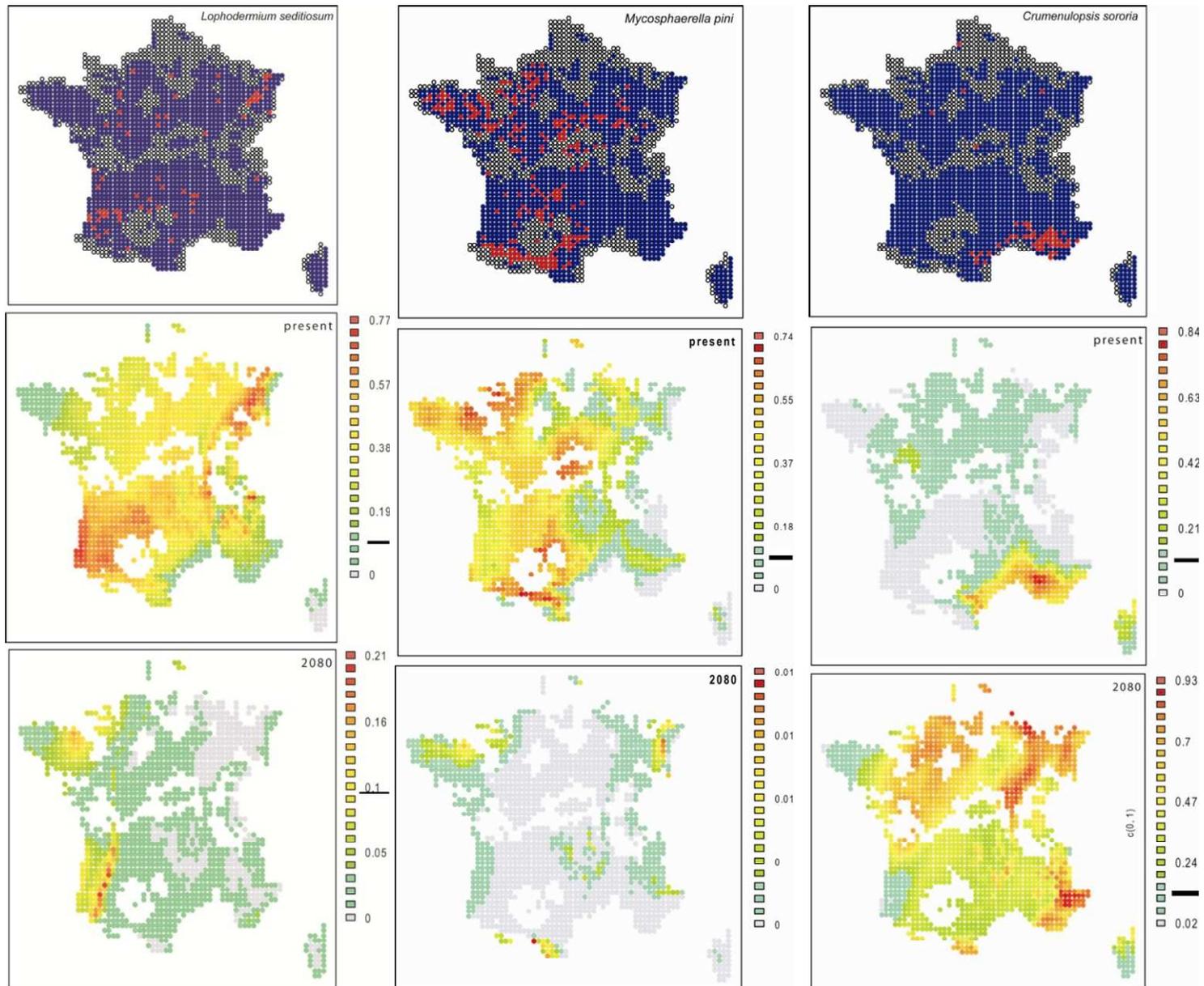
# Pourridiés



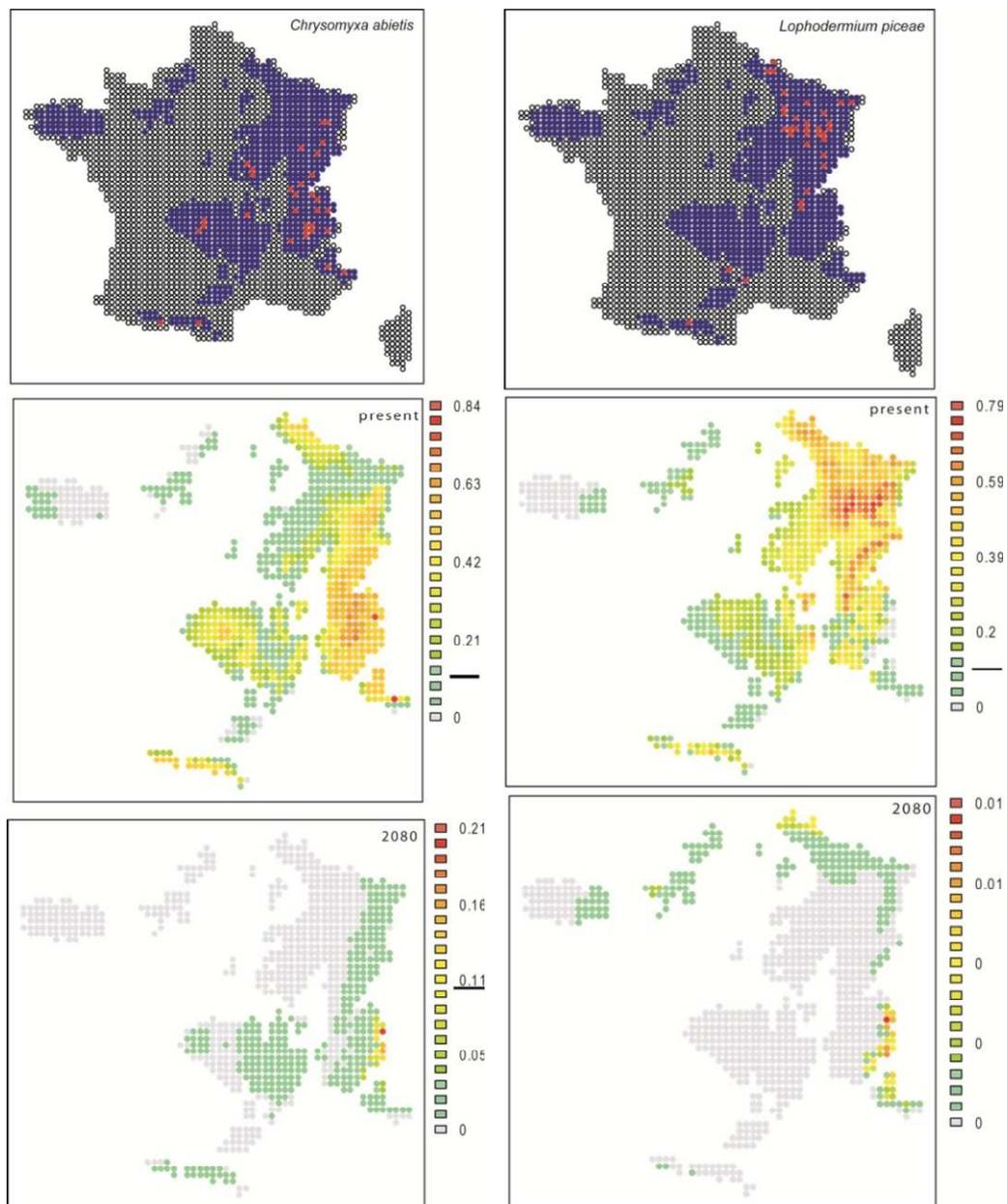
# Rouilles des pins



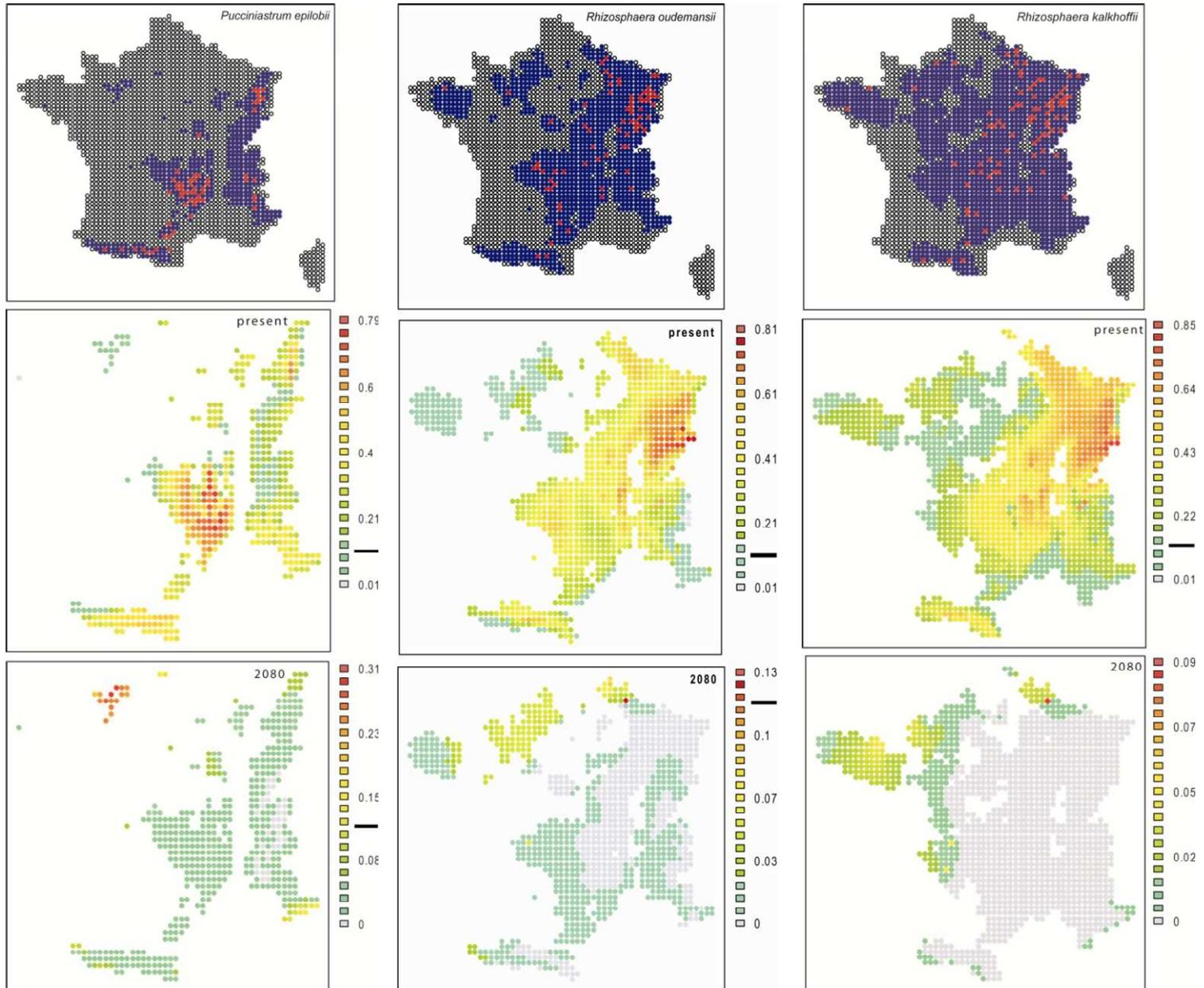
# Autres pathogènes des pins



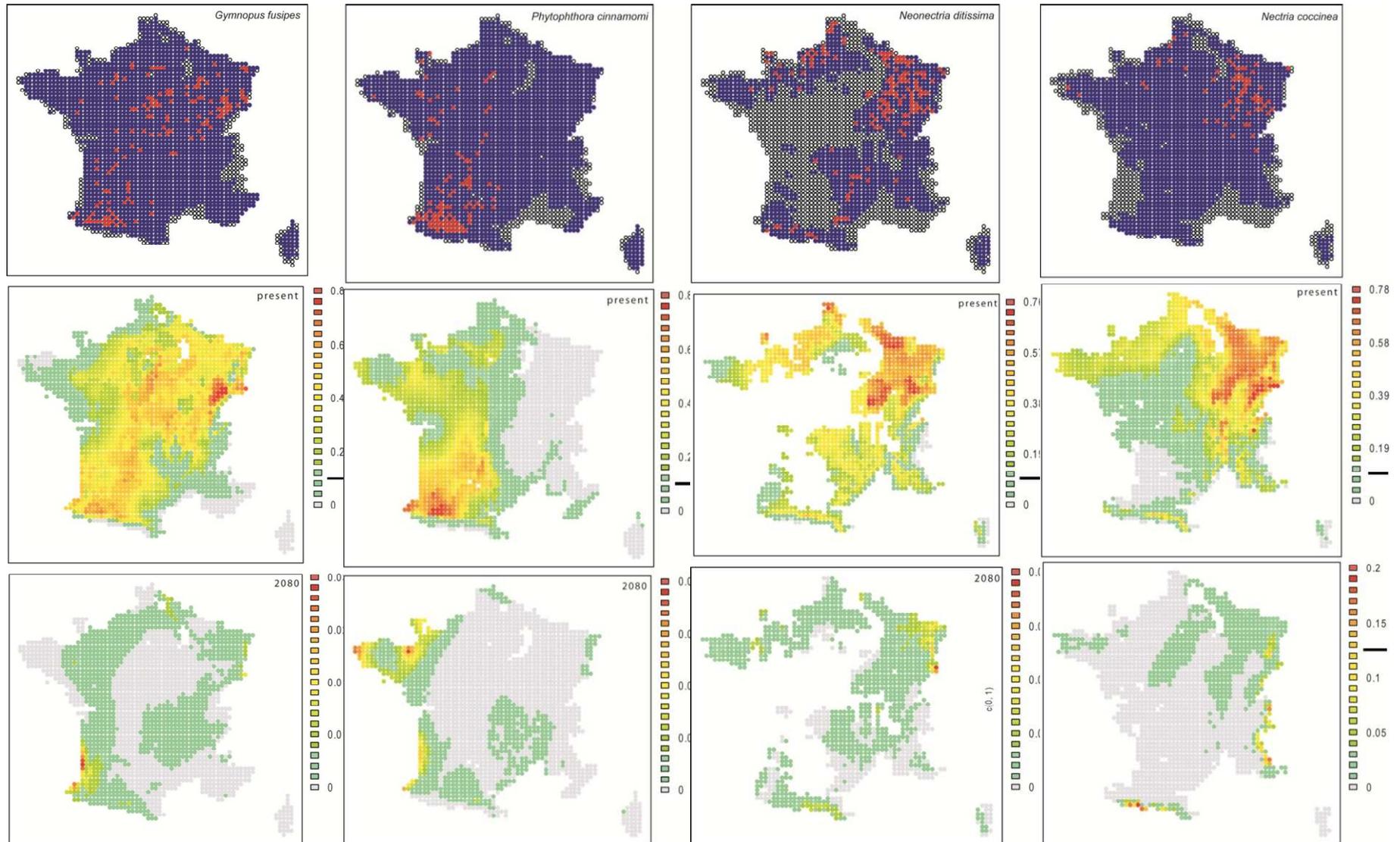
# Pathogènes foliaires des épicéas

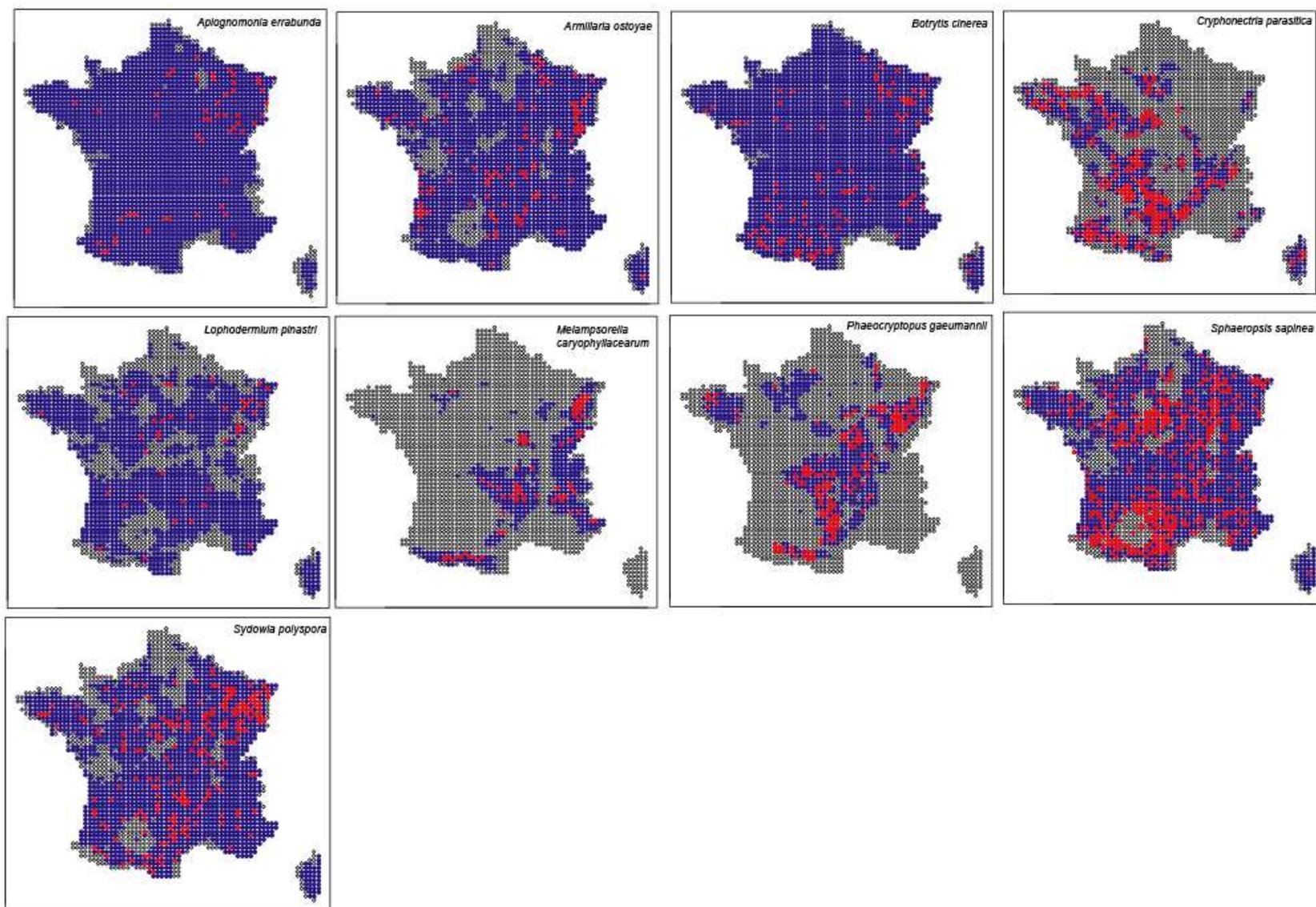


# Pathogènes foliaires des sapins et sapin de Douglas



# Pathogènes des chênes et du hêtre





Cartes représentant les données d'occurrence pour les espèces dont le modèle de niche n'était pas d'assez bonne qualité (AUC < 0.7)

## **Discussion**

### **Distribution des espèces et contraintes climatiques**

La principale contrainte et difficulté pour modéliser la niche des espèces réside dans la qualité des données initiales. Même si les nouvelles méthodes comme MaxEnt lèvent certaines contraintes, comme les données d'absence –souvent moins fréquemment relevées–, la disposition de données de présence sans biais d'observation est un préalable indispensable (Elith & Leathwick 2009). A ce titre, les parasites, en tant qu'organismes difficiles à observer et identifier présentent un handicap supplémentaire, ce qui explique la relative pauvreté d'études de ce type pour ces espèces par rapport à des plantes ou des animaux, malgré leur importance fonctionnelle (van der Putten et al 2010). Nous avons pu bénéficier d'une base de données relativement exceptionnelle pour un tel groupe d'organismes, avec près de 20 ans d'observations par des personnes expérimentées, pour le Département Santé des Forêts. Ceci permet de penser que les biais d'échantillonnage ne sont pas trop importants. Toutefois, il faut garder à l'esprit un certain nombre de limitations. En premier lieu, les observations concernent des symptômes, dans un contexte forestier. Une observation correspond donc à un niveau de population de pathogène « significative », affectant une population d'arbres hôtes, et pas seulement à une mention de présence de l'espèce. D'autre part, bien que le DSF fasse appel à un laboratoire spécialisé pour les identifications délicates (nécessitant des observations microscopiques ou un diagnostic moléculaire), un même symptôme peut correspondre à différentes espèces cryptiques de pathogènes, qui n'ont pas forcément exactement la même niche bioclimatique. Il a ainsi été montré récemment que l'oïdium du chêne était causé par plusieurs espèces, principalement *E. alphitoides* (largement prédominante) et *E. quercicola* (Mougou et al 2008, Mougou-Hamdane et al 2010), dont la niche bioclimatique est en cours d'étude. Les espèces des complexes *Lophodermium* n'ont été décrites qu'en 1978 (Minter et al) et plusieurs groupes ont fait l'objet de révisions taxonomiques encore plus récentes (par exemple, de Wet et al 2003).

Une autre hypothèse sous-jacente à la construction d'un modèle de niche est que la distribution observée correspond à un état d'équilibre de l'espèce avec son environnement. Une telle approche pour une espèce en cours de colonisation demande donc des précautions particulières. Or, certaines maladies forestières en Europe, et en France en particulier, sont causées par des parasites introduits (Desprez-Loustau *et al.* 2010). Toutefois, la plupart des maladies prises en compte ici correspondent à des introductions anciennes, 1907 pour l'oïdium, 1926 pour *P. gaumanii* sur Douglas, 1860 pour *P. cinnamomi*, 1854 pour *C.*

*ribicola*, 1956 pour *C. parasitica* sur Châtaignier, 1912 pour *M. pini* (Desprez-Loustau *et al.* 2010). Les parasites correspondants, tous parasites aériens excepté *P. cinnamomi*, semblent avoir rapidement colonisé l'ensemble de la distribution de leur arbre-hôte, comme en témoignent les pourcentages d'occupation parmi les plus élevés par rapport à l'ensemble des espèces. Les capacités de dispersion naturelle des *Phytophthora* sont considérablement renforcées par une forte dispersion assistée par l'homme, via le transport de plants contaminés (asymptomatiques) produits en pépinières (Mascheretti *et al.* 2008). Pour *P. cinnamomi*, la limite de colonisation observée est attribuée à l'existence d'une contrainte thermique à la survie de cette espèce d'origine tropicale, hypothèse confortée par plusieurs éléments (par exemple analyses dendrochronologiques – Robin *et al.* 1992). Du fait de sa sensibilité au gel, *P. cinnamomi* a fait l'objet des premières modélisations de niche associées à l'étude de l'effet du changement (en particulier réchauffement) climatique (Brasier & Scott 1994) et un modèle mécaniste est disponible pour modéliser sa survie hivernale (Marcais *et al.* 1996 ; 2004) sur lequel sont basées des prédictions plus récentes (Bergot *et al.* 2004).

Toutefois, il s'est avéré que les modèles obtenus par MaxEnt pour la plupart des espèces invasives possèdent un faible pouvoir de prédiction ( $AUC < 0.7$ ). Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que si l'espèce parasite occupe la plus grande partie de l'espace fourni par son hôte, il est difficile à l'échelle où nous travaillons (quadrats sur la France) de mettre en évidence des facteurs climatiques limitants.

Par contre, l'utilisation de MaxEnt a permis de proposer un modèle bioclimatique pour 19 espèces de champignons parasites forestiers importants, notamment la plupart des espèces d'origine européenne, ce qui constitue à notre connaissance la première étude aussi complète dans ce domaine. La quasi-totalité des modèles avec  $AUC > 0.7$  incluent des variables liées à la fois aux températures et aux précipitations. Il est remarquable que la variable la plus influente globalement représente les pluies estivales. Les champignons peuvent généralement se développer sur de larges gammes de température; par contre la présence de précipitations à certains moments du cycle est indispensable pour toutes les espèces, soit pour la libération soit pour la germination des spores (Desprez-Loustau *et al.* 2006). L'importance de la variable « pluies estivales » prendrait ainsi en compte la plus ou moins forte sensibilité des espèces à ce facteur, pouvant conditionner des niveaux élevés de population. Seul le modèle correspondant à *P. cinnamomi* ne comporte que des variables thermiques, en accord avec le rôle déterminant déjà connu de la contrainte thermique dans la biologie de cette espèce. Nous n'avons d'ailleurs pas pu analyser la distribution de cette espèce sur des gradients

altitudinaux, car il y avait trop peu de mentions en zones montagneuses dans la base du DSF (14 mentions dans les Pyrénées et deux dans le massif central).

Il nous avait semblé intéressant de réaliser l'étude de co-distribution des espèces hôte-pathogène, avec l'idée que la distribution des espèces sur des gradients altitudinaux peut révéler des adaptations à des contraintes environnementales, en particulier thermiques, et donc donner des indications sur leur évolution attendue sous l'effet d'un changement climatique (cf chapitre précédent et Figure 3). Cette approche n'a malheureusement pu être réalisée que sur un petit nombre d'espèces, et presque exclusivement dans le Massif Central. L'utilisation d'un « gradient altitudinal » dans cette région comme « proxy » de température est sans doute encore plus critiquable que pour les Alpes et Pyrénées, le Massif Central étant à la confluence d'influences climatiques contrastées, océaniques à l'Ouest, continentales au Nord et méditerranéennes au sud-est. Nous avons quand même présenté ces résultats tout en étant conscients de leurs limites. Les analyses de co-distributions sur ces gradients suggèrent que des facteurs liés à l'altitude pourraient limiter la distribution des parasites par rapport à celle de leurs hôtes pour 5 des 11 espèces étudiées. On peut remarquer que les deux espèces trouvées préférentiellement dans la zone la plus haute de distribution de leur hôte sont des rouilles avec hôte alternant. On peut donc se demander si l'effet altitude pourrait correspondre non seulement à l'effet d'un gradient thermique sur le pathogène mais également en partie de l'abondance de cet hôte alternant, dont la présence est nécessaire pour que le pathogène accomplisse son cycle. Pour *C. flaccidum*, les probabilités de présence actuelles calculées par MaxEnt à l'échelle de la France sont cohérentes avec l'analyse de codistribution pour le Massif Central mais on ne retrouve pas de tendance liée à l'altitude pour les autres zones montagneuses. Les deux premières variables sélectionnées par le modèle (avec une contribution de 63.9%) sont la saisonnalité des précipitations et la température du trimestre le plus humide. Deux des trois espèces montrant le patron inverse de co-distribution, *S. sapinea* et *M. pini*, sont des pathogènes des pins avec *P. nigra laricio* comme hôte préférentiel. Ici encore, on peut émettre l'hypothèse que le gradient altitudinal puisse correspondre à des effets climatiques directs sur le pathogène et indirects via l'hôte préférentiel. De façon intéressante pour *M. pini*, avec un effet altitudinal observé sur 2 massifs montagneux différents, on observe à l'échelle de la France un gradient de continentalité avec beaucoup plus de mentions à l'Ouest. Les deux premières variables sélectionnées par MaxEnt sont liées aux températures et des probabilités de présence très faibles sont obtenues pour toute la partie est du territoire, en particulier pour les Alpes.

## Effets d'un scénario de changement climatique

Le résultat le plus remarquable des simulations réalisées avec MaxEnt est la tendance quasi-généralisée à une très forte réduction de l'enveloppe bio-climatique des champignons pathogènes étudiés à l'échelle de la France (18 des 19 espèces avec un modèle performant). Ceci n'est pas lié à l'espace de projection du modèle sur la distribution actuelle de l'hôte, comme on le voit pour les espèces dont l'habitat potentiel couvre presque la totalité du territoire ; seules quelques espèces ont un habitat restreint mais il s'agit principalement d'espèces montagnardes.

Ce résultat était un peu inattendu. Les tout premiers articles s'intéressant aux effets potentiels du changement climatique sur l'impact des parasites et maladies, étaient plutôt alarmistes, en prédisant une tendance globale à l'augmentation (Harvell *et al.* 2002). Ceux-ci mettaient toutefois surtout en avant le réchauffement climatique, levant certaines contraintes du cycle des parasites et les capacités d'adaptation a priori plus rapides de ce type d'organismes par rapport à leurs hôtes à temps de génération plus lent, ce dernier facteur étant non pris en compte dans les modèles de niche.

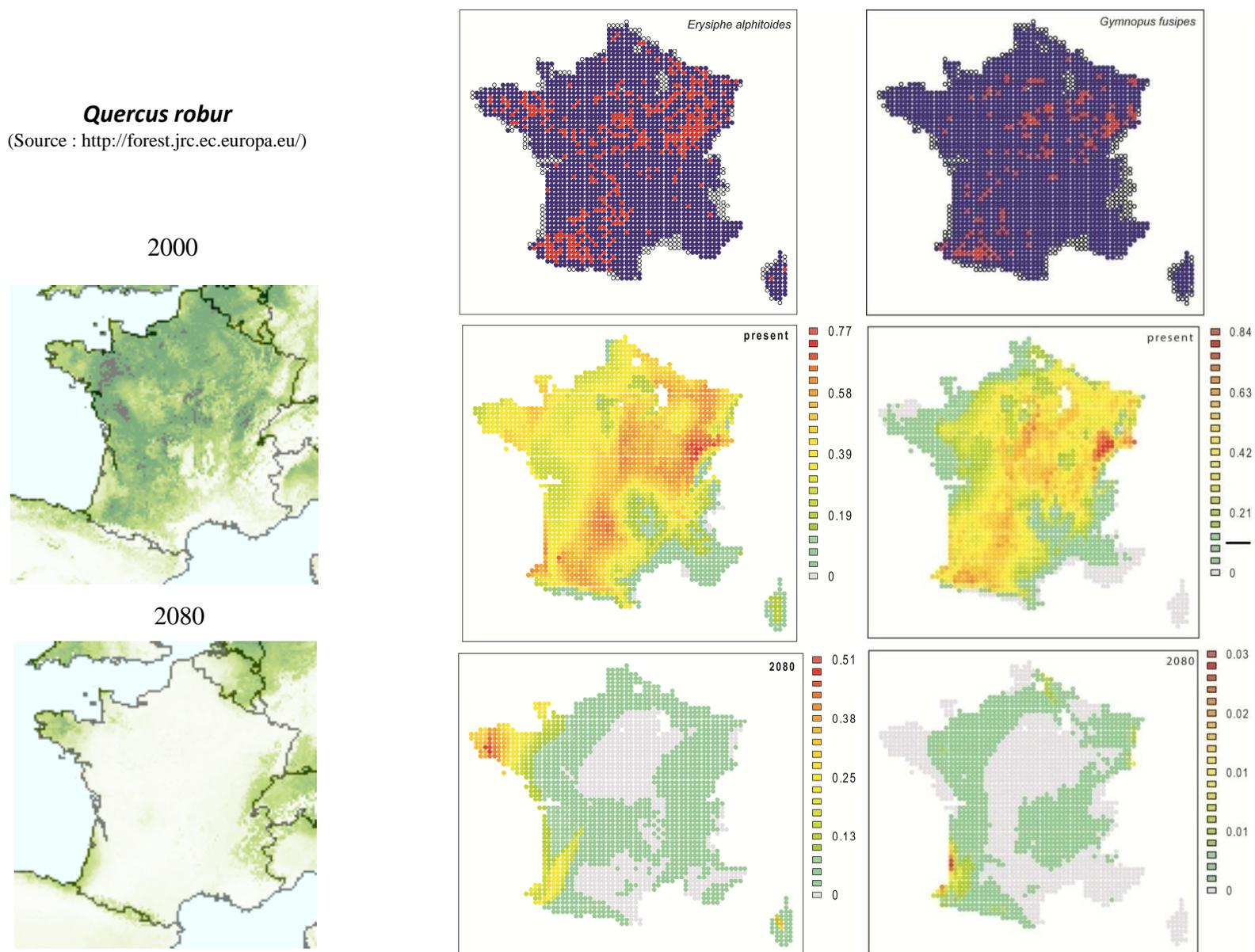
D'autres études plus récentes sur des champignons pathogènes forestiers, en utilisant d'autres approches pour la modélisation et les prédictions, ont montré que le changement climatique n'était pas systématiquement favorable, et qu'en particulier la réduction des pluies estivales en zone tempérée pouvait devenir un facteur limitant pour certaines espèces (Desprez-Loustau *et al.* 2006, 2010). Cette tendance est sans doute exacerbée ici par le fait que nous avons utilisé le scénario A2, alors que les études précédentes utilisaient le scénario B2. Le scénario A2 encore considéré comme très pessimiste il y a quelques années est maintenant considéré comme un des scénarios les plus réalistes, ayant pris la place de B2 (cf introduction). De plus nous nous sommes directement projetés à la fin du siècle, donc avec des effets maximaux, les courbes d'évolution prédites des variables climatiques montrant une tendance quasi monotone d'augmentation (température) ou de diminution (précipitations) sur la période (cf Figure 17).

Bien qu'il reste beaucoup d'incertitudes, à la fois sur les modèles climatiques (en particulier pour les précipitations, cf figures 11 et 12 de l'introduction) et surtout sur les modèles bioclimatiques de distribution des espèces, les résultats obtenus pour un scénario de changement climatique très fort (mais probable) dans plusieurs dizaines d'années nous paraissent suffisamment solides dans les tendances générales. Il faut ici rappeler la base de notre démarche, qui est de considérer d'abord l'habitat potentiel de l'espèce parasite,

correspondant à la présence de son hôte, qui est ensuite limitée par des contraintes d'ordre climatique. En effet, même pour les parasites non obligatoires qui représentent la majorité des espèces étudiées (à l'exception des rouilles), il n'existe que rarement des réservoirs permettant la survie en dehors des hôtes : ceci ne concernerait que les parasites des racines pouvant se maintenir dans le sol, mais leurs capacités saprophytiques sont généralement limitées. De plus, nous avons déjà mentionné que nos observations ne sont pas des « présences » au sens strict mais correspondent plutôt à des mentions de maladie sur peuplements. Nos modélisations à partir de variables climatiques prennent donc en compte non seulement l'effet plus ou moins direct du climat sur le parasite mais aussi très probablement un effet indirect lié à l'habitat fourni par son hôte. Le cas de l'oïdium du chêne permet de visualiser cette hypothèse (Figure 18 – l'AUC du modèle MaxEnt pour l'oïdium est légèrement en deçà du seuil fixé, mais les parasites du chêne sont les seuls pour lesquels nous pouvions directement comparer les distributions présentes et projetées avec celles de leur hôte, pour un même modèle et scénario de changement climatique). Les cartes obtenues pour *E. alphitoides* et *Quercus robur*, que ce soit pour la période actuelle ou future, comportent des similitudes remarquables. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la probabilité de présence du parasite est d'autant plus forte que son hôte est fortement présent, et donc que les variables climatiques favorisent la forte probabilité de présence de l'hôte. Bien qu'un certain effet de biais d'échantillonnage ne puisse être exclu (les correspondants-observateurs peuvent accorder plus d'importance aux parasites d'une essence dominante), cette corrélation repose sur des contraintes biologiques : de fait, plus un hôte est présent, plus un parasite qui lui est associé a de chances d'être présent, et surtout d'atteindre des niveaux de populations élevés. La relation positive entre intensité de maladie et densité d'hôtes, s'expliquant par une ressource plus abondante et une augmentation des capacités de transmission, a souvent été mise en évidence (Burdon & Chilvers 1982). Woods *et al.* (2005) pointent l'augmentation de la densité d'hôte, en interaction avec le changement climatique, comme facteur explicatif de l'émergence récente d'épidémies de *Dothistroma* sur pin en Colombie britannique. Watt *et al.* (2011) montrent une relation positive entre les indices écoclimatiques prédits pour la distribution actuelle de *Pseudotsuga menziesii* et l'impact observé de *Phaeocryptopus gaumanii*. Pour *M. pini* à l'échelle mondiale, Watt *et al.* (2009) arrivent à la conclusion que la distribution du parasite est (sera) surtout limitée par celle de son hôte, que les stress hydriques contraindront plus directement et fortement que l'enveloppe climatique du parasite. Ce lien entre contraintes écoclimatiques sur l'hôte et distribution des parasites associés pourrait être d'autant plus fort pour des parasites obligatoires aériens comme l'oïdium, comme le montre la

comparaison avec *Gymnopus fusipes*, autre parasite (non obligatoire) du chêne affectant les racines. Les effets directs du climat sur le pathogène et indirects via son hôte sont difficiles à isoler dans le cas de pathogènes affectant plusieurs espèces. Dans le cas de *C. sororia* par exemple, la forte présence en zone méditerranéenne peut s'expliquer à la fois par des conditions climatiques favorables au déroulement du cycle du champignon mais également, de façon non exclusive, par la présence d'un hôte préférentiel, *Pinus halepensis*. L'expansion prédite de *C. sororia* en 2080 correspond à l'expansion de la zone à climat de type méditerranéen vers le Nord, favorable à l'expansion du groupe chorologique associé auquel appartient *P. halepensis* (Badeau et al 2010). A l'inverse, les prédictions de forte réduction de l'enveloppe bioclimatique que nous mettons en évidence pour la plupart des parasites peuvent probablement s'expliquer en premier lieu par la très forte contrainte qui va s'exercer sur leurs hôtes, qui constituent l'habitat potentiel. Les simulations réalisées avec le scénario B2 montraient déjà un recul de tous les groupes chorologiques d'arbres forestiers présents en France à l'exception des espèces méditerranéennes et sud-atlantiques (Badeau et al 2010). Ce phénomène ne peut qu'être exacerbé avec le scénario plus sévère A2, conformément aux résultats présentés par le Joint Research Center de l'Union Européenne (<http://forest.jrc.ec.europa.eu/distribution>). En tendance générale pour le long terme, les menaces les plus graves pour les arbres forestiers sont à attendre en premier lieu de l'inadaptation au climat futur, plus que de l'impact des parasites déjà présents (sauf quelques cas particuliers), sans oublier la menace posée par l'introduction de nouveaux parasites. En effet, les introductions passées montrent que plusieurs espèces ont été capables de coloniser rapidement l'ensemble de l'habitat potentiel constitué par leur hôte, pour une large gamme de conditions climatiques. L'invasion en cours très rapide de *Chalara fraxinea* sur le frêne à l'échelle de l'Europe montre la réalité de telles menaces (Husson et al 2011).

Figure 18 : Distributions simulées pour deux parasites du chêne avec MaxEnt pour la période présente et 2080 (à droite : Oïdium et Collybie en fuseau) comparées à celles de leur hôte principal, *Quercus robur*, avec la méthode Random Forest en utilisant le même modèle de circulation générale (HadCM3) et le même scénario d'émission de GES (A2) (à gauche).



## **Perspectives**

Un certain nombre de points d'amélioration permettrait d'affiner notre étude. La prise en compte quantitative de la ressource hôte, par exemple en ajoutant une couche « abondance dans les quadrats » permettrait de mieux faire la part entre effets directs et indirects du climat sur le pathosystème. Par manque de temps, nous n'avons fait de simulation qu'à l'horizon le plus lointain permis par le scénario mais il serait intéressant de faire des prédictions intermédiaires, moins affectées par les incertitudes et qui seraient plus utiles pour la gestion. Celles-ci permettraient par exemple de visualiser les déplacements de risque pour certains parasites à l'échelle régionale ou des changements relatifs d'importance de parasites différents d'une même espèce dans un endroit donné.

Nous sommes bien conscients des limites du type d'approche utilisée, uniquement corrélatrice. Ce choix a été justifié par la volonté d'avoir une approche générale pour le plus grand nombre de parasites, et des données dont nous disposons. Les modèles mécanistes, basés sur des processus, sont *a priori* plus indiqués pour faire des prédictions. Toutefois, il n'en existe pas pour les espèces étudiées ici, à l'exception de *P. cinnamomi*. Quelques modèles génériques applicables à des pathogènes de plantes ont été décrits, comme Climex (Sutherst et al 1999) ou Nappfast (Magarey et al 2007) et utilisés pour un certain nombre d'espèces (Yonow et al 2004, Venette & Cohen 2006, Desprez-Loustau et al 2007, Watt et al 2009, 2011). Toutefois, les données pour estimer les valeurs des paramètres requis sont souvent encore très fragmentaires, ce qui introduit des incertitudes très importantes. Nos résultats sur l'importance relative des variables sélectionnées dans MaxEnt suggèrent que les efforts de modélisation des processus et de leur paramétrisation devront en particulier porter sur la réponse des parasites aux facteurs hydriques. La réponse aux fortes températures sera également sans doute à prendre en compte, avec ses interactions, compte tenu du fait qu'avec les scénarios actuels les plus probables, on risque d'aller au-delà de l'effet (approximativement) linéaire positif de l'augmentation de température pour atteindre des zones à effet dépressif.

Enfin, une limitation importante des modèles de distribution et de leur utilisation dans un contexte de changement climatique tient au fait qu'ils ne prennent pas en compte les capacités d'adaptation des espèces. Celles-ci peuvent être *a priori* importantes pour les parasites, avec des populations importantes, des temps de génération court et des capacités de dispersion élevées (Gandon & Michalakis 2002). Un aspect important de ces capacités

adaptatives concerne la possibilité de « sauts d'hôtes ». De tels phénomènes ont souvent été mis en évidence dans le cas de changements de distribution liés à des introductions (invasions) (Slippers et al 2005, Desprez-Loustau et al 2007). Ils pourraient également être favorisés par la colonisation de nouvelles zones géographiques favorisée par le changement climatique (Cullingham et al 2011). Plusieurs exemples, pour des insectes et des champignons, supportent cette hypothèse (Vanbergen et al 2003, Gange et al 2011). On peut également remarquer à cet égard que dans le cas de *Sphaeropsis sapinea*, les mentions à faible altitude concernent principalement *Pinus nigra* alors qu'à haute altitude, la plupart des mentions concernent une autre espèce, *P. uncinata*. Ainsi, les probabilités de présence calculées à partir des variables climatiques prédites pour le futur pourraient être projetées sur l'ensemble de l'espace (France) et non pas restreintes à la distribution des hôtes actuels.

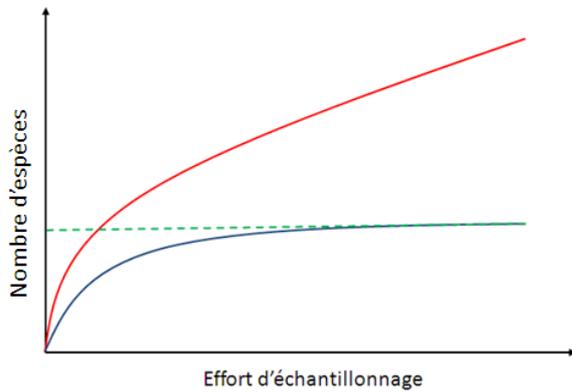
## **Discussion générale et perspectives**

### **I. Méthode d'étude des assemblages fongiques de la phyllosphère**

#### **1) Stratégie d'échantillonnage.**

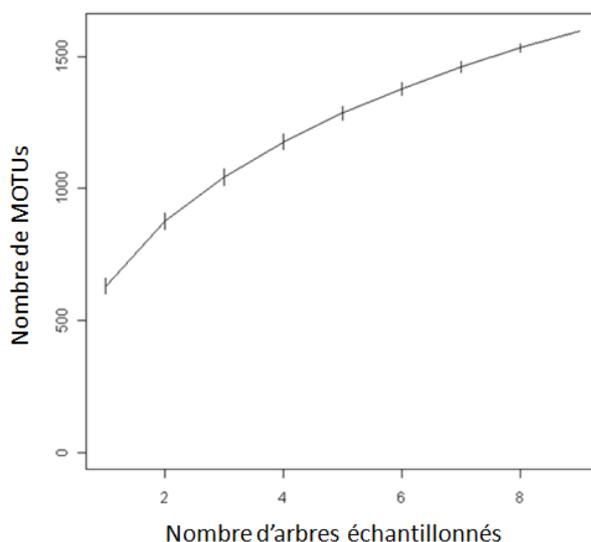
L'échantillonnage est d'une importance capitale dans les études d'écologie des communautés, et particulièrement dans le cas des études des communautés microbiennes par des approches moléculaires.

En effet, compte tenu du faible volume d'échantillon que l'on peut utiliser pour les extractions d'ADN et des dilutions d'ADN qui sont nécessaires avant PCR, chaque échantillon d'ADN correspond un très petit volume par rapport au volume de l'habitat pour lequel on souhaite caractériser la communauté microbienne. Par exemple, la communauté microbienne de la rhizosphère d'un arbre ne peut être caractérisée qu'à partir d'échantillons ne contenant qu'un gramme de sol tandis que la communauté microbienne de la phyllosphère d'un arbre ne peut être caractérisée qu'à partir de disques foliaires de quelques centimètres carrés. L'ADN total de chaque échantillon est extrait, mais la caractérisation de la communauté n'est en fait basée que sur quelques millièmes de cette quantité (à cause des dilutions). Il convient donc de trouver un compromis entre le nombre d'échantillons (qui détermine la faisabilité de l'expérience) et la représentativité des informations recherchées. L'exhaustivité de l'échantillonnage (nombre d'échantillons biologiques et effort de séquençage par échantillon) peut être évaluée avec des courbes de raréfaction en espèces (Figure 19).



**Figure 19 :** Nombre cumulé d'espèces en fonction de l'effort d'échantillonnage (nombre d'échantillons ou effort de séquençage). L'échantillonnage est exhaustif lorsque la courbe de raréfaction atteint un plateau (en bleu).

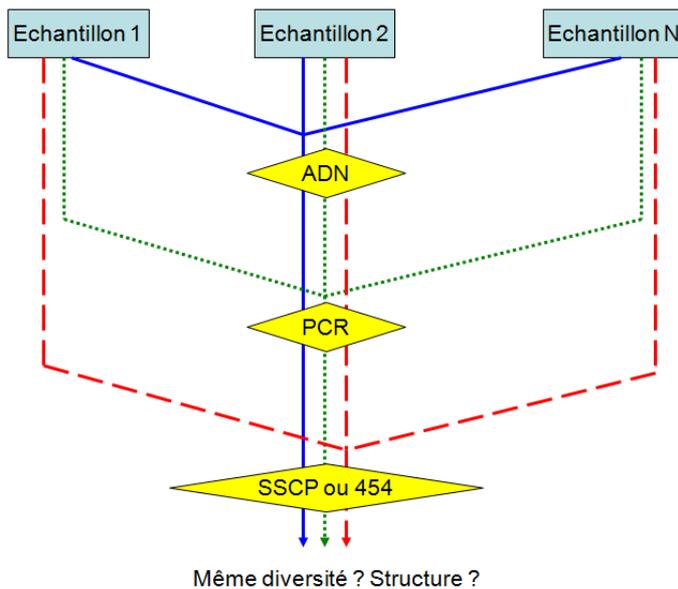
Par exemple, dans le chapitre 1, nous avons décrit les assemblages fongiques de la phyllosphère de 9 arbres d'une même parcelle de hêtre. La courbe de raréfaction (Figure 20) montre qu'il faudrait échantillonner un nombre d'arbres plus élevé pour décrire de manière exhaustive l'assemblage fongique de la parcelle. Une question à laquelle nous n'avons pas répondu au cours de la thèse est celle du nombre de feuilles qu'il faut échantillonner sur un arbre pour obtenir une description exhaustive des assemblages fongiques de sa phyllosphère. Les résultats obtenus dans le chapitre 1, qui montrent que les assemblages fongiques sont très variables d'une feuille à l'autre et que la dissimilarité entre les assemblages augmente avec la distance entre les feuilles, laissent penser qu'il faut échantillonner un grand nombre de feuilles, réparties dans toute la canopée.



**Figure 20 :** Nombre cumulé de MOTUs en fonction du nombre d'arbres échantillonnés dans la parcelle de hêtre, calculé à partir des résultats obtenus dans le chapitre 1.

Puisqu'il faut collecter plusieurs échantillons (de sol, de feuilles...) pour caractériser la communauté microbienne vivant dans un habitat donné, il est souvent nécessaire de mélanger ces échantillons à un moment donné du protocole expérimental (Figure 21). Le mélange des échantillons peut se faire directement après la collecte. Ce mélange semble naturel pour les études de sol (homogénéisation des différents échantillons de sol). Le mélange peut aussi se faire après extraction de l'ADN total, ou après amplification par PCR. Il est important de noter que plus le mélange des échantillons est réalisé tardivement, plus l'expérience est coûteuse et longue à réaliser. Si la technique utilisée pour décrire la communauté est peu onéreuse (comme par exemple, la CE-SSCP) on peut envisager de traiter chaque échantillon séparément jusqu'à la fin de l'expérience. C'est ce que nous avons fait dans le chapitre 1 : chaque feuille a été traitée séparément et nous avons obtenu un profil CE-SSCP par feuille. Etant donné le coût des amorces marquées pour le 454, nous n'avons pas pu faire de même lorsque nous avons utilisé le pyroséquençage 454 : nous avons mélangé les échantillons avant PCR (mélange des extraits d'ADN d'un même groupe de feuilles) et nous avons effectué un second mélange avant le séquençage 454 (mélange des amplicons d'une même branche). Dans le chapitre 2, nous avons aussi mélangé les échantillons avant PCR (mélange des extraits d'ADN d'un même arbre) puis avant le séquençage 454 (mélange des amplicons d'une même grappe de 5 arbres). Nous ne connaissons pas l'effet de ces mélanges sur la structure observée des assemblages fongiques.

L'effet du mélange des échantillons sur la structure observée des communautés microbiennes a été étudiée par quelques auteurs dans le cas d'études du sol (Schwarzenbach *et al.* 2007 ; Manter *et al.* 2009). Ces études suggèrent que le mélange d'échantillons peut masquer une partie des espèces détectables, d'autant plus que le sol est hétérogène, quelque soit l'étape à laquelle le mélange est réalisé. A notre connaissance, il n'existe aucune étude de ce type pour les communautés microbiennes de la phyllosphère. Des expériences sont en cours au laboratoire, dans le cadre de la thèse de Boris Jakushkin (2011-2014), pour déterminer le nombre de feuilles qu'il faut échantillonner sur un arbre pour obtenir une description exhaustive des assemblages fongiques de sa phyllosphère.



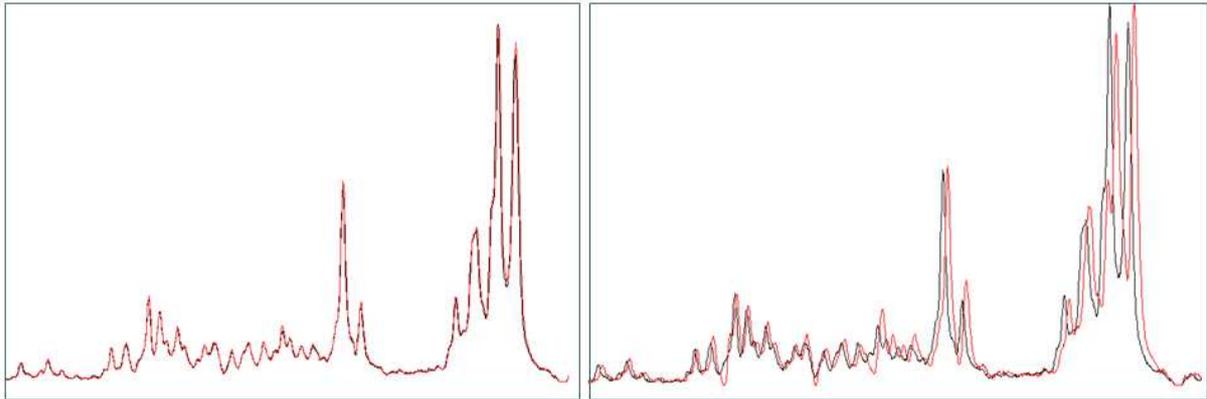
**Figure 21 : Approche par mélange pour choisir une stratégie d'échantillonnage. En bleu : les échantillons sont mélangés avant extraction de l'ADN. En vert : chaque échantillon est extrait séparément, puis les échantillons sont mélangés pour amplification et SSCP ou pyroséquençage. En rouge : chaque échantillon est extrait et amplifié séparément, avant d'être mélangé avec les autres pour SSCP ou pyroséquençage.**

## 2) La CE-SSCP et le problème de l'alignement des profils

La CE-SSCP permet de traiter un grand nombre d'échantillons à un coût modéré, et est fiable dans un cadre comparatif de communautés, en richesse et en composition (Danovaro *et al.* 2006 ; Zinger *et al.* 2008). Les limites connues de cette technique sont le problème de co-migration de phylotypes différents (un pic peut représenter deux ou plusieurs taxons différents) et la saturation de profil lorsque la communauté est trop complexe. Il a été montré, par simulation, que cette saturation est atteinte à partir de 35 phylotypes (Loisel *et al.* 2006). Dans le chapitre 1, nous n'avons pas eu de problèmes de saturation des profils, le nombre de pics ne dépassant que rarement 25.

Toutefois, nous avons été confrontés à un problème de répétabilité des profils. En effet, des répétitions techniques ont été réalisées et ont montré que certains pics restaient décalés, même après alignement sur le marqueur de taille ROX (Figure 22). Ceci pourrait s'expliquer soit par la technique en elle-même (hétérogénéité de conformation dans l'espace pour des fragments identiques), soit d'un problème d'erreur de la taq polymérase (voir Gury *et al.* 2008), soit des conditions de migration dans l'appareil. Pourtant, d'après Zinger *et al.* (2008) la CE-SSCP est une technique reproductible, avec des variations de migration très faibles pour des fragments identiques, ce qui nous fait plutôt pencher pour un problème de

biologie moléculaire. Le manque de répétabilité des profils pourrait par exemple venir du fait que nous avons utilisé une taq polymérase standard, qui pourrait avoir généré des substitutions, et augmenter ainsi la variabilité de migration. Ainsi, le haut niveau de variance entre feuilles dans le chapitre 1 pourrait venir d'un problème d'alignement des profils. Une manière de procéder pour limiter les effets de ces décalages entre aurait été de dupliquer ou tripler les profils par feuille, pour faire une moyenne des profils avant analyse de variance.



**Figure 22 : Illustration du problème de décalage des pics après alignement sur le marqueur de taille ROX. A gauche : Un échantillon (en noir) correctement aligné avec une répétition technique (en rouge), avec le programme StatFingerprint (Michelland *et al.* 2009). A droite : le même échantillon aligné avec une autre répétition technique. On sait qu'il s'agit du même échantillon, et on voit qu'il s'agit des mêmes pics, mais l'alignement sur le ROX ne suffit pas pour avoir un alignement correct des deux profils. Ces décalages pourraient avoir fait monter artificiellement le niveau de variance entre feuilles (entre échantillons) dans le premier chapitre.**

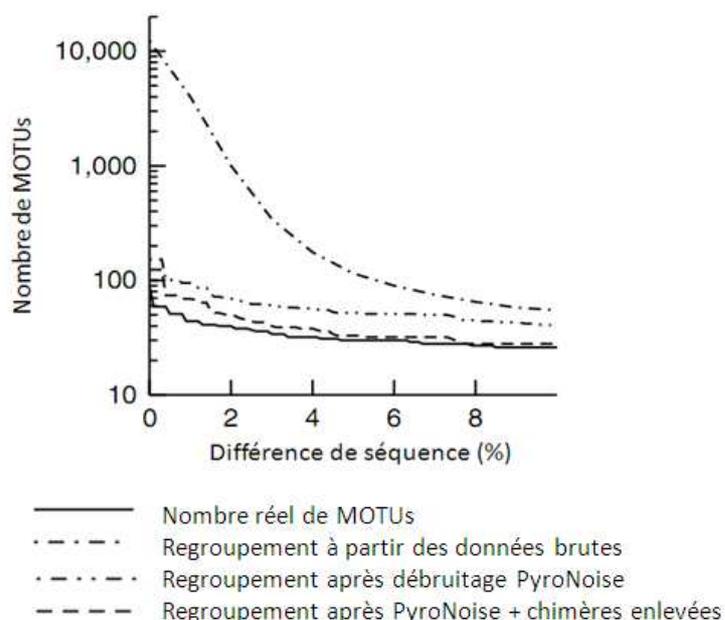
### **3) Le pyroséquençage 454 et ses limites**

Le pyroséquençage, en plus d'offrir une couverture bien plus complète de la communauté microbienne que la CE-SSCP, offre la possibilité d'identifier taxonomiquement les MOTUs. Il existe toutefois des limites biologiques et techniques à l'utilisation de ce type de données.

Les limites biologiques concernent la variabilité intra versus interspécifique du marqueur choisi (voir introduction). Pour les champignons, il existe des espèces à forte variabilité de l'ITS, pouvant dépasser 5% (Lindner & Banik, 2011), ce qui génère des MOTUs divisées (plusieurs MOTUs sont assignées à la même espèce) lorsqu'on utilise un seuil de similarité pour définir les MOTUs. Nous avons été confrontés à ce problème de MOTUs divisées dans les chapitres 1 et 2, en utilisant 3% comme seuil pour séparer les MOTUs. Une alternative à cette approche avec seuil de similarité est l'approche de type

MEGAN (Huson *et al.* 2007), c'est-à-dire le blast de toutes les séquences sur une base de données pour l'assignation taxonomique et pour générer l'inventaire des espèces. Quelque soit la méthode utilisée (MEGAN ou assignation taxonomique après regroupement des séquences par seuil de similarité), les assignations pourront parfois être erronées et les séquences d'organismes inconnus seront délaissées (à cause des erreurs d'annotation dans les bases de données et de leur manque d'exhaustivité). Toutefois, en couplant ces deux approches, c'est-à-dire en utilisant MEGAN pour inventorier dans un premier temps les espèces connues sans biais de seuil de similarité, et un regroupement des séquences inconnues en MOTUs dans un deuxième temps, nous devrions améliorer les assignations taxonomiques et les estimations de richesse.

Les limites techniques concernent les méthodes elles-mêmes (PCR et pyroséquençage) et les algorithmes pour regrouper les séquences en MOTUs. Des études ont montré que les erreurs liées à la PCR (substitutions réalisées par la taq polymérase, formation de chimères) et au pyroséquençage (problème avec les homopolymères notamment, dont la longueur est souvent l'objet d'erreur) étaient responsables d'une surestimation importante du nombre d'espèces (Quince *et al.* 2009 ; Reeder & Knight, 2009 ; Dickie, 2010 ; illustré en Figure 23). Ainsi, des outils de traitement des données brutes de sortie des séquenceurs ont été proposés pour réduire le « bruit » lié à ces problèmes (Quince *et al.* 2009 ; Reeder & Knight, 2009). Nous n'avons pas utilisé ces outils de traitement récents dans les chapitres 1 et 2, le nombre de MOTUs que nous avons obtenu est donc probablement surestimé.



**Figure 23 :** Nombre de MOTUs générées pas pyroséquençage de 90 clones de 16S bactériens connus, en fonction du seuil de similarité et du type d'approche pour le traitement des données brutes. Adapté depuis Quince *et al.* 2009.

Les algorithmes de regroupement des séquences en MOTUs sont aussi à l'origine de biais. Les algorithmes les plus utilisés sont CD-HIT (Li *et al.* 2006), Blastclust ou encore UCLUST (Edgar, 2010), qui auraient tendance à regrouper des séquences qui ne devraient pas l'être (donc à sous-estimer la richesse en MOTUs). En utilisant UCLUST dans les chapitre 1 et 2, nous avons pourtant repéré des MOTUs distinctes alors que la dissimilarité entre certaines de leurs séquences était en dessous de 3%. En regroupant les séquences représentatives des MOTUs avec le même seuil, nous arrivons aussi à regrouper quelques MOTUs, ce qui montre que UCLUST tend plutôt sur-estimer la richesse en MOTUs.

D'autres alternatives existent pour définir les MOTUs, comme l'utilisation d'algorithme de regroupement de graphe (MCL ou Markov Chain Clustering Algorithm, Enright *et al.* 2002), qui améliorent ces estimations de richesse. MCL a récemment été utilisé avec l'ITS et la LSU fongique, et montre que les groupes (MOTUs) générés par cette approche sont plus cohésifs, c'est-à-dire que les nœuds sont mieux connectés entre eux (plus de séquences d'un groupe ont un niveau de similarité inférieur ou égal au seuil fixé) (Zinger *et al.* 2009). Une méthode utilisant les modèles de coalescence pour définir les MOTUs a également été développée et appliquée aux communautés fongiques (sur le 18S), montrant que cette méthode est plus performante que le regroupement de séquences en MOTUs sur la base d'un seuil de similarité (Powell *et al.* 2011). Toutefois, cette dernière approche nécessite un alignement des séquences pour pouvoir construire un arbre phylogénétique, ce qui n'est pas possible dans le cas de l'ITS fongique.

Plus généralement, la fiabilité de l'usage de l'ITS comme barcode environnemental, pour faire des « approximations d'espèces » (MOTUs), a été remis en cause récemment chez les endophytes (Gazis *et al.* 2011, Valstrad, 2011). Cette dernière étude a montré, sur la base d'autres marqueurs nucléaires, que l'ITS ne permettait pas de distinguer les espèces chez trois complexes d'espèces d'endophytes dominantes en milieu tropical. Malheureusement, il n'existe pas aujourd'hui d'alternative crédible à l'usage de l'ITS comme barcode fongique. Même si les approches multi locus (c'est-à-dire une phylogénie) sont les mieux adaptées pour délimiter les espèces (Roe *et al.* 2010 ; Gazis *et al.* 2011), il est impossible d'utiliser ce type d'approche dans les études de génomique environnementale puisque nous ne pourrions pas faire de lien entre les loci utilisés, lien possible uniquement dans le cas de culture d'isolat.

#### **4) CE-SSCP ou pyroséquençage ?**

Ces deux méthodes culture indépendantes permettent d'avoir un descriptif des communautés microbiennes, mais le coût et les informations fournies sont différents et le choix de l'une ou l'autre des méthodes devrait dépendre de la question biologique posée. Si le but est de dégager des patrons de structure avec un grand nombre d'échantillons, la CE-SSCP est indiquée car elle est rapide, peu onéreuse et suffisamment résolutive. Par contre, si la question biologique implique d'avoir une approximation du nombre d'espèces présentes, d'identifier ces espèces, ou d'avoir des informations phylogénétiques, le pyroséquençage permet, à des coûts de plus en plus réduits, d'avoir des données abondantes et plus précises.

#### **5) Comment prendre en compte les espèces rares ?**

Certains auteurs ont déclaré que le nombre d'espèces microbiennes dans un échantillon était au delà de toute possibilité de calcul (Wilson, 1999, cité par Fierer, 2008). Encore aujourd'hui, aucune étude n'est parvenue à décrire la totalité des espèces présentes dans un échantillon. Diverses méthodes ont été proposées pour estimer le nombre total d'espèces présentes, basées soit sur des modèles de distribution d'abondance (Unterseher *et al.* 2011), soit sur des estimateurs telles que chao ou ACE, qui se basent sur le nombre de singletons (revue dans Hugues *et al.* 2001).

La question du traitement des singletons (séquences présentes en un seul exemplaire) dans les études d'écologie microbienne n'est pas résolue : doit-on en tenir compte pour estimer la richesse (chao ou ACE) ou les enlever ? D'un côté, ils représentent la « biosphère rare », mais de l'autre, il peut s'agir d'erreurs de séquençage. Pour tenter de s'affranchir du biais lié à ces singletons, il a été proposé de retirer un individu (une séquence) pour chaque MOTU, les singletons étant alors supprimés et les MOTUs à deux séquences devenant singletons (Unterseher *et al.* 2011). Les MOTUs à deux séquences représentent très probablement une vraie séquence biologique, compte tenu de la probabilité très faible de générer deux séquences identiques (ou proche) par erreur de séquençage. Dans le chapitre 1, nous avons choisi de les laisser pour les analyses multivariées, et nous les avons enlevés dans le deuxième (avant raréfaction du jeu de donnée). Cependant, dans les deux chapitres, avoir une approximation du nombre d'espèces n'était pas indispensable car notre objectif était de tester des hypothèses sur les facteurs structurant les assemblages, en comparant les assemblages en termes de composition et d'abondance plutôt qu'en termes de richesse.

Le statut fonctionnel des espèces rares est ambigu. Dans le cas de la phyllosphère, ces espèces rares pourraient représenter des espèces migrantes à partir du pool d'espèces régional, sans fonction sur l'habitat feuille (Unterseher *et al.* 2011). Dans notre étude sur la variabilité spatiale, nous avons séparé les « MOTUs noyau », c'est-à-dire présentes dans plus de 50% des échantillons, et les « MOTUS satellites », présentes dans moins de 50% des échantillons. Nous avons montré que les MOTUs noyau sont responsables de la majorité de la variance expliquée entre les arbres, suggérant que ces MOTUs représentent des espèces effectivement actives et interagissant avec les arbres, alors que les MOTUs satellites n'expliquent que peu de variance. Nous avons conclu que les MOTUs satellites devaient représenter des espèces épiphytes inactives ou n'interagissant pas avec les arbres, et que leur structure spatiale dans la parcelle était stochastique. Pourtant, une étude récente, utilisant à la fois une approche de séquençage d'amplicons et de métatranscriptomique, c'est-à-dire basées sur les ARN transcrits, a montré que des espèces rares pouvaient représenter une part importante des activités métaboliques dans un sol (Baldrian *et al.* 2012). Un tel patron pourrait être vérifié sur les communautés microbiennes épiphytes en ayant une approche métatranscriptomique.

## **6) Relier composition et fonction des assemblages fongiques**

Déterminer la fonction d'une espèce fongique de la phyllosphère est soumis à plusieurs difficultés. D'une part, nous avons vu précédemment (cf. I. 2) que le mode de nutrition a évolué de manière indépendante dans différents clades, il n'est donc pas possible de relier un groupe taxonomique à une fonction. Ceci est également vrai chez les champignons strictement endophytes (Arnold *et al.* 2009). D'autre part, il existe un continuum fonctionnel chez les champignons de la phyllosphère (Saikkonen *et al.* 1998 ; Shultz & Boyle, 2005). Certaines espèces peuvent passer d'un état mutualiste à un état parasite au cours de leur cycle de vie (Newton *et al.* 2010), à cause d'un changement environnemental comme par exemple un changement de régime lumineux (Álvarez-Loayza *et al.* 2011), ou encore indirectement par un état de faiblesse de l'arbre hôte (suite à une sécheresse par exemple), ce qui est le cas des champignons de la famille des Botryosphaeriaceae (Slippers & Wingfield, 2007). On peut aussi observer des changements fonctionnels suite à la mutation d'un seul gène (Tanaka *et al.* 2006) ou suite à l'interaction avec un insecte (Pehl & Butin, 1994).

Les approches utilisées dans le cadre de cette thèse ne permettent pas de distinguer les individus vivants et actifs des individus morts ou inactifs. Dans les chapitres 1 et 2, il était donc difficile de relier structure et fonction des assemblages fongiques. Les approches de métatranscriptomique permettent, en plus de faire un inventaire des espèces vivantes présentes, d'avoir des informations sur les activités métaboliques d'une communauté microbienne au moment de l'échantillonnage. Dans notre cas, cette approche aurait été difficile à mener car nous avons travaillé sur la phyllosphère, qui est un habitat vivant. Nous aurions eu des difficultés à séparer les ARN de la plante de ceux des champignons ou des autres microorganismes. Il aurait toutefois été possible d'avoir cette approche si nous nous étions restreints aux assemblages microbiens épiphytes, en isolant mécaniquement les microorganismes vivant uniquement à la surface des feuilles (Suda *et al.* 2008 ; Delmotte *et al.* 2009).

## II. Les facteurs structurant les assemblages fongiques de la phyllosphère.

Nous avons montré que plusieurs facteurs, probablement en interaction, peuvent structurer les assemblages fongiques de la phyllosphère. Dans le premier chapitre, nous avons montré qu'un facteur biotique, la distance génétique entre arbres, était plus explicatif que la distance géographique entre arbres dans une parcelle de hêtre. Dans le deuxième chapitre, nous avons mis en évidence que les facteurs climatiques pouvaient expliquer la structure observée le long d'un gradient d'altitude. L'échelle d'étude à laquelle on se place détermine donc les facteurs qui structurent ces assemblages, ce qui est courant en écologie (Levin, 1992). La figure 24 résume cet aspect en illustrant les différents filtres structurant les assemblages fongiques endophytes en fonction de l'échelle spatiale.

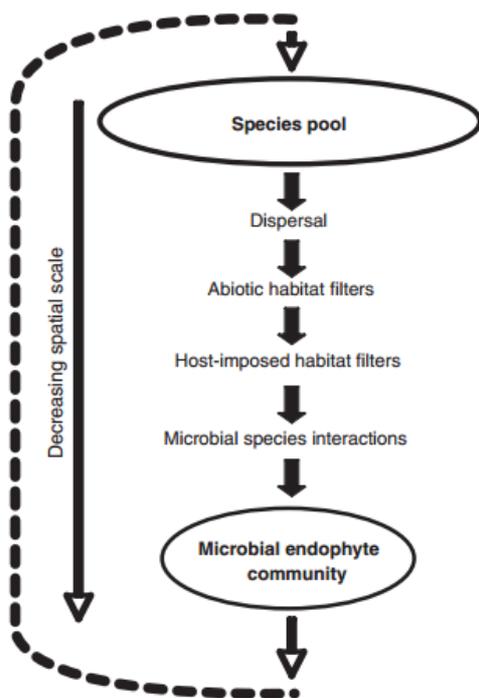


Figure 24 : Différents filtres structurant les assemblages fongiques de la phyllosphère en fonction de l'échelle spatiale (d'après Saunders *et al.* 2010).

## **1) Les facteurs biotiques : génotype de l'hôte et traits fonctionnels foliaires**

Parmi les facteurs biotiques pouvant modifier les assemblages fongiques, on peut citer la dispersion par d'autres espèces (insectes, oiseaux), l'interaction avec d'autres microorganismes (bactéries, virus) ou l'interaction avec l'arbre hôte. Nous ne considérons ici que les facteurs liés à l'arbre hôte.

Dans le chapitre 1, nous avons montré que la distance génétique entre arbres explique mieux la structure des assemblages fongiques que la distance géographique à l'échelle d'une parcelle forestière. Ce résultat suggère un effet du génotype de l'hôte sur les assemblages associés, ce qui est en accord avec les études en génétique des communautés (Bailey *et al.* 2009). Ces variations génétiques contrôlent, au moins en partie, le phénotype foliaire des arbres. Il est donc possible que l'effet du génotype reflète une réponse des assemblages foliaires aux traits foliaires (teneur en macroéléments et sucres de surface, masse foliaire par unité de surface, mouillabilité de la feuille).

Des études sur les variations et le déterminisme environnemental et génétique des traits fonctionnels du hêtre ont été menées le long du gradient pyrénéen dans le cadre de la thèse de Caroline Bresson (2011). Des tendances altitudinales significatives ont été montrées pour les six traits étudiés *in situ*. L'étude de ces mêmes traits en test de provenance a permis de montrer que les variations étaient très majoritairement sous contrôle environnemental, sauf pour deux d'entre eux, qui semblent être en partie sous contrôle génétique. Environ 4% de la variation de la masse foliaire par unité de surface et 8% de la variation de la teneur en azote des feuilles sont expliqués par la provenance des individus (Bresson *et al.* 2011). Il est donc possible que la corrélation entre distance génétique et dissimilarité des assemblages fongiques détectée dans le chapitre 1 soit le reflet de telles variations de traits sous contrôle génétique.

Chez le maïs, une étude a montré, en utilisant des mutants pour la synthèse d'un composé de défense anti-fongique, que ce composé a un effet sur les assemblages d'endophytes (Saunders *et al.* 2009). Les espèces dominant les assemblages des plantes produisant le composé sont tolérantes au composé de défense anti-fongique alors que les espèces dominant les assemblages des plantes ne produisant pas le composé ne sont pas tolérantes. Il a aussi été montré que les variations génétiques du peuplier noir ont un effet sur les assemblages d'endophytes de l'écorce via la concentration en composés phénoliques de celle-ci (Bailey *et al.* 2005).

Il apparaît donc que les variations génétiques intra-spécifiques de la plante hôte ont un effet indirect sur les assemblages fongiques associés, via un effet direct sur les filtres liés au phénotype (« host-imposed habitat filters », Figure 24). Ces résultats font écho au concept de phénotype étendu proposé par Dawkins (1982), et aux études de génétique des communautés (Whitham *et al.* 2003).

## **2) Les facteurs abiotiques : effet de la température dans les Pyrénées**

Dans le chapitre 1, nous avons montré une corrélation positive entre la dissimilarité des assemblages fongiques et la distance entre groupes de feuilles dans la canopée d'un même arbre. Nous avons aussi vu que la majorité des espèces de la phyllosphère ont un pouvoir de dispersion important, qui n'est pas limitant à l'échelle de la canopée. Ceci suggère que des facteurs biotiques ou abiotiques, variables à l'échelle de la canopée, peuvent structurer les assemblages fongiques. Les variations de composition des assemblages fongiques que nous avons observées au sein de la canopée du hêtre pourraient provenir soit d'un effet direct d'un gradient microclimatique entre l'intérieur de la canopée (proche du tronc) et l'extérieur, soit d'un effet d'un gradient de valeurs de traits foliaires, généré par plasticité phénotypique, pour des raisons microclimatiques également (voir chapitre précédant pour une discussion sur les traits foliaires). Nous aurions pu tester cela en plaçant des capteurs météorologiques (température, humidité et ensoleillement) à chaque point de prélèvement dans la canopée et en caractérisant une série de traits foliaires sur les feuilles dont sont extraits les disques foliaires (en utilisant le reste de la feuille).

Dans le chapitre 2, nous avons montré que les facteurs climatiques, notamment la température moyenne à long terme, était la variable climatique la plus explicative de la structure des assemblages fongiques de la phyllosphère le long du gradient altitudinal pyrénéen. Nous avons aussi montré que les variations de température à court terme pouvaient expliquer les variations des assemblages fongiques d'une année sur l'autre. Toutefois, d'autres paramètres potentiellement structurant co-varient avec l'altitude et la température (Körner, 2007), comme les rayonnements UV (Newsham *et al.* 1997; Moody *et al.* 1999) et les variations de pression atmosphériques (Marchisio *et al.* 1997). De plus, la variation de composition végétale n'a pas été prise en compte, alors qu'elle peut influencer sur l'inoculum environnant. Nous avons essayé de minimiser cet effet en échantillonnant uniquement des forêts composées de plus de 50% de hêtre, mais le contrôle total de ce facteur en milieu

naturel est impossible. Enfin, comme mentionné précédemment, les variations dans les traits foliaires du hêtre, qui sont partiellement sous contrôle génétique, pourraient aussi expliquer les variations altitudinales des assemblages fongiques foliaires. Séparer l'effet de la température sur les assemblages fongiques foliaires de ceux des autres facteurs est donc très difficile en se basant sur des observations réalisées le long d'un gradient altitudinal. L'utilisation de transplantations réciproques entre sites altitudinaux pourrait permettre d'éclaircir le rôle du climat dans la structuration des assemblages fongiques de la phyllosphère.

### 3) Perspectives et autres valorisations des données

#### a) Tester l'importance relative du climat et de la variation génétique de l'hôte sur les assemblages fongiques

Les transplantations réciproques permettent de tester explicitement l'effet de l'environnement et de la variation génétique sur un trait quantitatif afin de construire des normes de réactions (Reed & Martiny, 2007). Les assemblages fongiques de la phyllosphère pouvant être vus comme un trait quantitatif, il serait intéressant d'utiliser ce type de dispositif pour évaluer l'importance relative du climat et de la variation génétique des hôtes sur les assemblages fongiques associés. Un tel dispositif a été mis en place dans les Pyrénées dans le cadre de la thèse de Yann Vitasse (2006-2009) et de Caroline Bresson (2007-2011) (figure 25).

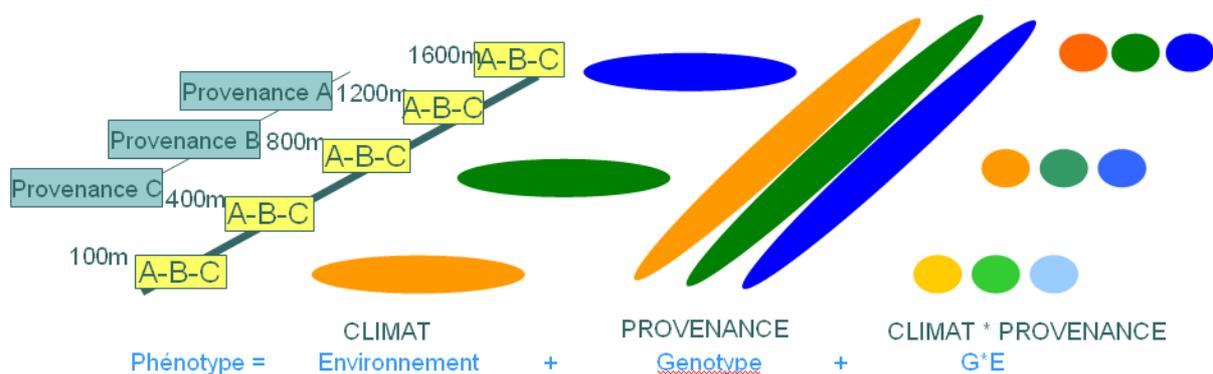


Figure 25 : Dispositif de transplantations réciproques mis en place le long du gradient pyrénéen.

Ce dispositif devait être étudié dans le cadre du projet européen BACCARA, mais nous avons finalement choisi de ne pas réaliser cette étude. En effet, le dispositif de transplantations réciproques n'avait pas été mis en place pour étudier les communautés microbiennes et il

présentait quelques inconvénients pour nos questions. Tout d'abord, le nombre de plants par modalité (altitude de provenance x altitude de transplantation) nous a paru trop faible pour caractériser correctement les assemblages fongiques associés à chaque modalité. Le nombre de plants initialement transplantés était de 4 par modalité (x 2 réplicats par modalité) mais la mortalité des plants au cours de l'expérience avait réduit ce nombre à 0 ou 1 dans presque 20% des cas. De plus, afin de ne pas perturber les autres mesures réalisées sur le dispositif, nous ne pouvions prélever qu'une seule feuille par plant. Pour certaines modalités, la description de la communauté microbienne aurait donc été basée sur une seule feuille prélevée sur un seul plant, ce qui paraît nettement insuffisant. Enfin, les plants avaient été transplantés sans penser à une étude future des communautés microbiennes et il n'est pas exclu que des micro-organismes (notamment du sol) aient eux aussi été transplantés. La mise en place d'un nouveau dispositif de transplantations réciproques semble donc nécessaire pour évaluer l'importance relative du climat et de la variation génétique intra-spécifique du hêtre sur les assemblages fongiques de la phyllosphère. Nous pourrions ainsi évaluer l'interaction de ces deux facteurs, qui constitue un attendu majeur compte tenu des résultats présentés dans les chapitres 1 et 2.

### **b) Tester l'hypothèse de la spécialisation d'échelle (SSH)**

L'hypothèse de la spécialisation d'échelle (SSH pour « Scaled Specialization Hypothesis ») postule que plus la taille des organismes est petite, plus la variation de composition des assemblages le long d'un gradient physico-chimique est importante (Kaspari *et al.* 2010). Les auteurs ont testé cette hypothèse en étudiant la différenciation de trois groupes d'organismes de taille différente (bactéries de la litière forestière, champignons de la litière et fourmis) le long de deux gradients environnementaux (1 gradient de fertilisation et 1 gradient d'altitude). Les résultats montrent que la composition des assemblages bactériens varie de manière significative le long des deux gradients tandis que la composition des assemblages de fourmis ne varie pas. La composition des assemblages fongiques varie uniquement le long du gradient topographique (Table 1). Si l'on suppose que la relation de taille entre les trois groupes d'organismes est bactérie < champignon < fourmi, alors ces résultats vérifient l'hypothèse de la SSH.

TABLE 1. Changes in taxocene composition (tested with MANOVA) as a function of N, P, and K factorial fertilization, and blocking on topography.

Source	df	Bacteria			Fungi			Ants		
		Roy's root	F	P	Roy's root	F	P	Roy's root	F	P
N	1	0.545	8.75	0.0017	0.145	1.53	0.2403	0.0205	0.22	0.8079
P	1	0.311	3.27	0.0580	0.119	1.25	0.3071	0.0587	0.62	0.5493
K	1	0.0471	0.49	0.6166	0.0445	0.47	0.6332	0.0587	0.62	0.5495
NP	1	0.221	2.32	0.1225	0.2205	2.15	0.1409	0.0620	0.65	0.5316
NK	1	0.0439	0.46	0.6366	0.0116	0.12	0.8861	0.0151	0.16	0.8545
PK	1	0.0527	0.55	0.5833	0.106	1.12	0.3462	0.259	2.72	0.0894
Topography	3	0.850	6.24	0.0032	0.523	3.84	0.0238	0.219	1.6	0.2173
Error	22									

**Tableau 1 : Variation de composition des assemblages de bactéries, de champignons et de fourmis le long de deux gradients, l'un chimique (N, P et K) et l'autre physique (topographique). Les différences significatives sont indiquées en jaune. Les assemblages bactériens sont différents le long du gradient chimique (azote et phosphore) et topographique, les assemblages fongiques sont différents le long du gradient topographique et enfin les assemblages de fourmis ne sont pas significativement différents le long des deux gradients (Tableau extrait de l'article de Kasapari et al. 2010)**

Pour tester cette hypothèse sur les communautés microbiennes de la phyllosphère du hêtre, nous nous sommes intéressés aux assemblages bactériens sur les mêmes échantillons que ceux utilisés pour décrire les assemblages fongiques le long du gradient altitudinal pyrénéen. Les assemblages bactériens ont été décrits grâce à une collaboration avec Jessica Vallance et Patrice Rey de l'UMR SAVE (INRA, ENITA Bordeaux). Selon l'hypothèse de la SSH, les assemblages bactériens devraient être plus différenciés que les assemblages fongiques le long du gradient altitudinal, puisque les bactéries sont de taille inférieure aux champignons. Les analyses préliminaires montrent que la composition des assemblages bactériens varie de manière significative le long du gradient altitudinal pyrénéen (Figure 26), tout comme celle des assemblages fongiques (chapitre 2). Elles montrent aussi que deux échantillons qui ont des assemblages fongiques différents tendent à avoir des assemblages bactériens différents (Figure 27). Cependant, nos résultats suggèrent que les dissimilarités entre assemblages bactériens ne sont pas supérieures à celles des assemblages fongiques (Figure 27), ce qui va à l'encontre de l'hypothèse de la SSH. Une publication commune sur ce sujet est prévue.

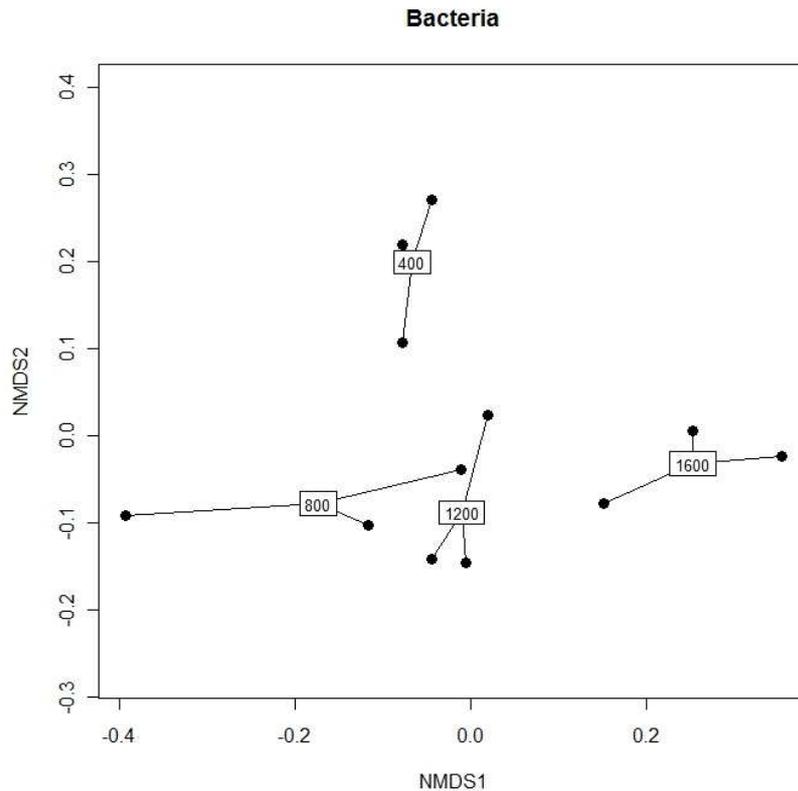


Figure 26 : Représentation, sur une NMDS (gradation non métrique multidimensionnelle), des dissimilarités entre les assemblages bactériens de la phyllosphère du hêtre le long d'un gradient altitudinal dans le massif des Pyrénées. Chaque point correspond à l'assemblage bactérien d'une grappe de 5 arbres. Les assemblages reliés entre eux sont ceux d'un même site d'altitude (400m, 800m, 1200m et 1600m). Les échantillons foliaires correspondant à cette analyse ont été prélevés en juillet 2009.

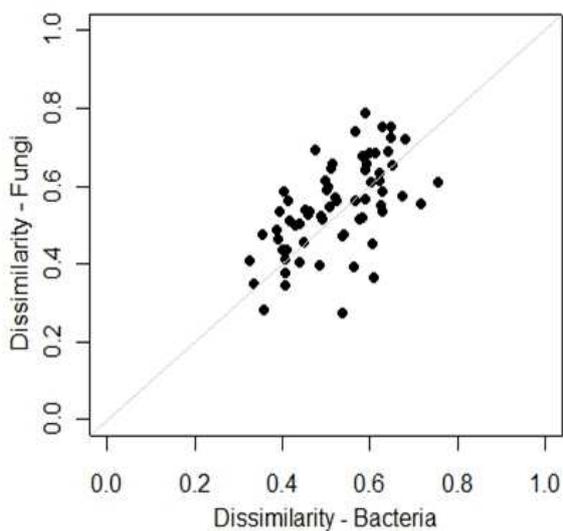


Figure 27 : Dissimilarité des assemblages fongiques entre deux échantillons prélevés le long du gradient altitudinal pyrénéen en fonction de la dissimilarité des assemblages bactériens entre les deux mêmes échantillons. L'indice de dissimilarité est l'indice de Jaccard. Un test de Mantel montre une corrélation significative entre les deux matrices de dissimilarité ( $r=0.58$ ,  $p=0.001$ ). L'alignement des points sur la première bissectrice suggère que le degré de différenciation des assemblages bactériens le long du gradient est similaire à celui des assemblages fongiques.

### **c) Vérifier l'effet de la température sur les assemblages fongiques le long de trois gradients d'altitude**

Dans le cadre du projet européen BACCARA, nous avons aussi élargi nos analyses à d'autres gradients altitudinaux, pour vérifier si le patron de variation des assemblages était similaire à celui observé dans les Pyrénées. Trois sites ont été échantillonnés dans les Alpes (de 750 à 1450 mètres) et dans les Vosges (de 380 à 1180 mètres) en juillet 2010, grâce à une collaboration avec Aurore Coince, Marc Buée et Benoit Marçais de l'UMR Interactions Arbre-Microorganismes (UMR IaM, INRA Nancy) ainsi qu'avec Georges Kunstler et Emmanuel Defosse (IRSTEA Grenoble). Les données des trois gradients ont été partiellement analysées, selon la même démarche que dans le chapitre 2, à la différence du traitement bioinformatique, incluant cette fois une étape de débruitage des données brutes avec l'algorithme publié par Reeder & Knight (2009) et un retrait des chimères potentielles avec UCHIME (Edgar, 2011). Comme dans le chapitre 2, nous avons utilisé les données climatiques issues du modèle AURELHY (1971 – 2000), pour identifier les variables les mieux explicatives des patrons de variations.

Avec les 160953 séquences obtenues pour les trois gradients, le regroupement des séquences par UCLUST a permis d'obtenir 1101 MOTUs avec un seuil de similarité de 3% (dont 32% de singletons). Dans le chapitre 2, qui portait sur le gradient pyrénéen uniquement, nous avons obtenu 3729 MOTUs avec 206073 séquences (dont environ la moitié de singletons). Etant donné que l'on pourrait s'attendre à avoir plus d'espèces dans cette étude par rapport au chapitre 2, puisque que l'on couvre trois gradients géographiquement éloignés, l'étape de débruitage a donc un impact majeur sur l'estimation de richesse.

La gradation non métrique multidimensionnelle présentée ci-dessous (Figure 28) montre un effet de l'altitude et un effet du massif (Pyrénées, Vosges et Alpes) sur la composition des assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre. Comme dans le chapitre 2, la température moyenne à long terme est le facteur climatique le plus explicatif des variations altitudinales de composition. Les précipitations pendant le printemps semblent expliquer la différence entre massifs. Le nombre de jours de gel durant le printemps explique à la fois la structure altitudinale et la différence entre massifs. Une tendance intéressante qui se dégage est que plus on monte en altitude, plus les assemblages ont tendance à se rapprocher sur l'ordination, donc plus ils sont similaires. Cela suggère que les conditions de haute altitude constituent un filtre environnemental plus contraignant que les conditions de basse altitude, et ont les même effets sur les assemblages, quelque soit le massif. L'hypothèse

d'un filtre environnemental plus fort dans les conditions de haute altitude sera testée prochainement en évaluant la diversité phylogénétique des assemblages fongiques le long du gradient.

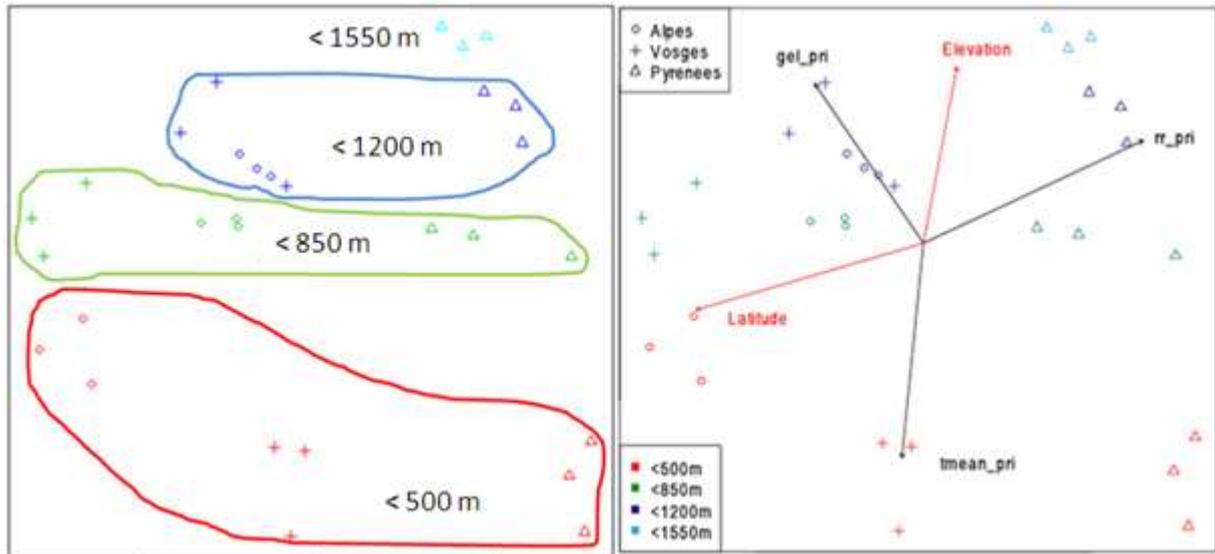


Figure 28 : Représentation, sur une NMDS (gradation non métrique multidimensionnelle), des dissimilarités entre les assemblages fongiques de la phyllosphère du hêtre le long de trois gradients altitudinaux, situés dans les Pyrénées, les Alpes et les Vosges. L'indice de dissimilarité entre assemblages est l'indice de Canberra. Gel\_pri : nombre moyen de jour de gel au printemps, tmean\_pri : température moyenne au printemps, rr\_pri : précipitations moyennes au printemps.

#### d) Tester l'hypothèse d'un filtre par l'habitat dans les conditions de haute altitude

Le choix du gène pour l'étude des communautés microbiennes détermine le type d'informations obtenues. Avec l'ITS fongique, nous avons pu décrire la composition des assemblages fongiques (nombre et abondance relative des MOTUs, assignation taxonomique au niveau spécifique), et tester différentes hypothèses sur les facteurs structurant les assemblages fongiques de la phyllosphère. L'utilisation d'un gène moins polymorphe (LSU par exemple), donc moins résolutif pour identifier une espèce, permet d'obtenir des informations sur la diversité phylogénétique d'une communauté. Ce type d'information permet de tester des hypothèses sur les facteurs écologiques régissant l'assemblage de ces communautés (Webb *et al.* 2002, Cavender-Bares *et al.* 2009 ; Morlon *et al.* 2011).

Ainsi, une tendance à une diversité phylogénétique d'une communauté moins grande par rapport à un attendu nul a été interprétée comme l'effet d'un filtre par l'habitat,

conduisant des espèces partageant des traits physiologiques proches à coexister dans le milieu (Webb *et al.* 2002 ; Cavender-Bares *et al.* 2009, Figure 29). En effet, si les traits physiologiques liés à la réponse des champignons au climat sont plutôt conservés phylogénétiquement, on peut s'attendre, en haute altitude, à la co-existence d'espèces capables de survivre sous un climat extrême, et donc phylogénétiquement proches (« regroupement phylogénétique »). En revanche, à basse altitude, on peut s'attendre à ce que le filtre par l'habitat soit moins fort et que les processus d'assemblage des communautés soient plutôt des processus comme la compétition ou la facilitation, qui limitent la similarité des espèces et conduisent à une « sur-dispersion phylogénétique » (Pausas & Verdu, 2010) Ces hypothèses seront prochainement testées sur les échantillons des trois gradients altitudinaux, le séquençage de la LSU fongique étant en cours.

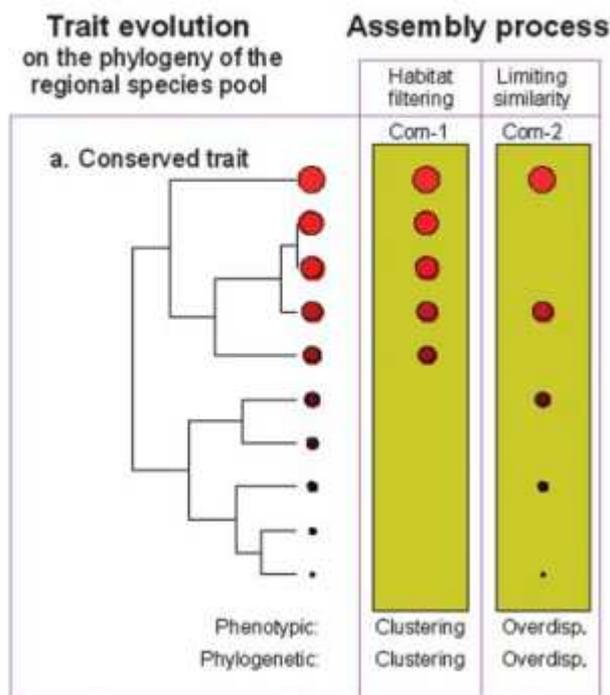
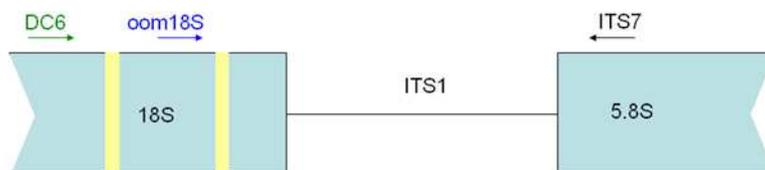


Figure 29 : Illustration de l'attendu sous l'hypothèse d'un conservatisme phylogénétique de niche (extrait de Pausas & Verdu, 2010).

## e) Diversité et structure des assemblages de Péronosporales de la rhizosphère du hêtre le long de gradients d'altitude

Dans le cadre de la collaboration avec l'équipe de l'INRA Nancy et l'IRSTEA de Grenoble, nous avons aussi échantillonné la rhizosphère du hêtre le long des trois gradients altitudinaux (Alpes, Vosges et Pyrénées) pour étudier les assemblages de Péronosporales, un groupe qui comporte de nombreux pathogènes racinaires des arbres (*Phytophthora*, *Pythium*). Dans ce cadre, j'ai développé une amorce (appelée oom18S, Tableau 2) et une nested PCR (Figure 30) pour l'amplification spécifique de l'ITS1 de ce groupe d'organismes à partir d'extraits d'ADN de sol. Les deux amorces DC6 et ITS7 (Tableau 2), qui sont utilisées en première PCR, sont issues de la publication de Cooke en 2000. Leur spécificité a été testée *in silico* par blast sur GenBank ainsi que sur des ADN de cultures pures de *Phytophthora*, *Pythium*, *Saprolegnia*, *Leptolegnia*, Diatomées et Champignons. L'amorce oom18S, flanquant la dernière région polymorphe du 18S avant l'ITS1, a été dessinée avec l'outil PrimerBlast (NCBI) et est utilisée en deuxième PCR. L'idée est d'extraire, à partir d'une même séquence, deux informations à des niveaux taxonomiques différents: une information spécifique avec l'ITS1 et une information au niveau du genre ou de l'ordre avec la dernière région variable du 18S. La taille des amplicons générés avec cette amorce est d'environ 440 paires de base, ce qui est compatible avec les technologies actuelles de 454.



**Figure 30 : Localisation des amorces utilisées et des zones variables dans le 18S chez les oomycètes (en jaune). Les amorces DC6 et ITS7 sont utilisées en première PCR, pour amplifier spécifiquement les Péronosporales. Les amorces oom18S et ITS7 sont utilisées en deuxième PCR, pour obtenir une longueur d'amplicon séquençable.**

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées, taille des amplicons générés avec l'amorce ITS7 utilisée comme amorce reverse et résultats des tests de blast contre GenBank (août 2010)

Amorce	Cible	5' --> 3'	Sens	Taille	Fungi	Oomycètes	Diatomées	Source
DC6	18S	GAGGGACTTTTGGGTAATCA	F	590	-	X	-	Cooke et al. 2000
oom18S	18S	GCGCATCGTGCTAGGGATAG	F	440	a	X	X	Cette étude
ITS7	5.8S	AGCGTCTTCATCGATGTGC	R	-	a	X	a	Cooke et al. 2000

X : Supérieur à 10 matches à 100% sur les organismes ciblés

a : Inférieur à 10 matches à 100% sur les organismes ciblés

Cette procédure a récemment été validée par l'obtention des données sur les trois gradients qui seront analysées à Nancy. Une publication commune est prévue pour cette étude.

### III. Effets potentiels du changement climatique

#### 1) Quelles approches ?

Les effets potentiels du changement climatique sur la distribution des espèces est un sujet qui fait l'objet de nombreuses études depuis une quinzaine d'années. On peut schématiquement considérer 3 grands types d'approches :

- 1) Des approches *a posteriori*, portant sur l'analyse de la réponse des espèces à des changements climatiques passés. Les échelles temporelles peuvent grandement varier. Certaines études concernent par exemple la recolonisation post-glaciaire du continent européen par différentes espèces de ligneux, avec l'utilisation conjointe de la phylogéographie (marqueurs génétiques) et de la paléoécologie (pollens) (Petit et al 2003). D'autres études s'adressent aux changements survenus dans les dernières décennies, dont les traces sont déjà visibles dans la variation altitudinale de la composition des assemblages végétaux par exemple (Lenoir et al 2008).
- 2) Des approches prédictives basées sur des modèles mécanistes. Le modèle décrit un système en intégrant les fonctions de réponse de différents processus aux variables climatiques et peut être utilisé avec tout jeu de données climatiques, du passé (pour validation) ou du futur (pour projection). Les approches prédictives sont couramment utilisées pour les modèles de fonctionnement des écosystèmes, par exemple l'évolution de la production primaire des forêts sous l'effet d'un changement climatique (Ciais et al 2010). Leur utilisation est limitée pour la distribution des espèces par l'existence de modèles adéquats. De tels modèles comportent généralement un niveau de généralité pour un groupe d'organismes, avec des paramètres à documenter pour chaque espèce. Un modèle de ce type a par exemple été proposé pour des arbres forestiers (Morin et al 2007). Le modèle Climex, développé initialement pour les insectes (Sutherst et al 1999) et appliqué pour quelques champignons pathogènes (cf chapitre 3), relève de cette approche mais avec un niveau de détail des processus très grossier.
- 3) Des approches « d'extrapolation du présent » basées sur des modèles largement empiriques, issus des observations de distribution actuelle des espèces mises en relation avec des variables climatiques actuelles et dont on teste les sorties avec un forçage correspondant aux données de climat futur prédit. Bien qu'on puisse penser

que ces approches ont la performance de prédiction attendue la plus faible, elles sont en pratique les plus couramment utilisées du fait des exigences non remplies des deux autres approches précédemment décrites (indisponibilité de données anciennes, de pollen ou de distribution ; pas de modèle mécaniste). De très nombreux modèles de distribution d'espèces ont ainsi été développés au cours des dernières années et utilisés pour des projections avec différents scénarios pour le climat futur. Ceux développés sur champignons ou parasites (cf chapitre précédent, Sacks et al 2004) sont encore très peu nombreux au regard de ceux concernant des plantes (Marmion et al 2009).

L'étude que nous avons réalisée s'inscrit dans cette troisième approche. Climex avait été utilisé pour quelques espèces de pathogènes forestiers européens dans un projet précédent du laboratoire (Desprez-Loustau et al 2007). Toutefois, même le relativement petit nombre de paramètres nécessités par Climex, à commencer par les plus simples (par exemple 4 températures correspondant au minimum, 1<sup>er</sup> optimum, 2<sup>ème</sup> optimum et maximum de croissance) était difficile à documenter pour la plupart des espèces. L'utilisation d'une méthode récente de construction de modèles empiriques basée sur l'apprentissage automatique et le maximum d'entropie nous a permis de développer un modèle satisfaisant et de tester les effets d'un scénario de changement climatique sur les principaux champignons pathogènes forestiers en France (chapitre 3). Malheureusement des données du type de celles collectées par le DSF ne sont pas disponibles au niveau de l'Europe, une échelle à laquelle les limites climatiques auraient sans doute été plus fortes.

L'étude de gradients altitudinaux s'inscrit également dans une approche empirique avec une échelle spatiale plus restreinte (un ou quelques massifs montagneux, mais une résolution plus élevée par rapport aux quadrats de 16\*16 km à l'échelle de la France. L'intérêt de ces gradients réside justement dans ces fortes variations environnementales, en particulier température, sur de courtes distances géographiques : on estime généralement que la diminution de température observée pour 100 mètres d'altitude supplémentaire est du même ordre que celle observée en allant 100 km vers le Nord, dans notre hémisphère (environ 0.6°C). Toutefois dans notre cas, les études réalisées sur les gradients altitudinaux avaient essentiellement pour but de tester l'influence de la température comme facteur structurant de la composition des assemblages fongiques et de la présence de certains agents pathogènes en particulier, et n'avaient qu'une très faible visée prédictive. Par manque de données, nous n'avons malheureusement pas pu relier les résultats obtenus entre les 2 approches sur

gradients altitudinaux, en particulier Pyrénéen (chapitre 2 et co-distribution du chapitre 3) et l'approche de modélisation à l'échelle de la France.

## **2) Le réchauffement, oui mais...**

Le rôle de la température comme filtre environnemental est fortement suggéré par nos résultats du chapitre 2, étendus à d'autres gradients altitudinaux dans les Vosges et les Alpes. Le réchauffement est d'autre part la composante du changement climatique qui est la plus avérée et fait l'objet des plus faibles incertitudes pour le futur (cf résultats concordants des différents modèles, Figure 17 du chapitre 3). Le fort réchauffement prévu, en particulier dans le scénario A2, va donc fortement affecter la distribution des espèces. Toutefois, nos modèles d'enveloppe climatique montrent que des variables liées aux précipitations sont très importantes, en particulier les pluies estivales apparaissent comme la variable globalement la plus influente à l'échelle de notre étude. On peut donc s'attendre à des effets d'interaction, allant jusqu'à des influences opposées (effet positif du réchauffement et négatif du stress estival) de ces deux facteurs, ce qui rend caduques des prédictions simples comme la remontée en altitude. Nos résultats sur ce point confortent ceux obtenus avec Climex (Desprez-Loustau et al 2007), avec sans doute des effets exacerbés en passant du scénario B2 au scénario A2, notamment avec le modèle HadCM3 qui se singularise pour les précipitations (Figure 17 du chapitre 3). L'importance des variables liées au régime de précipitations impose également de prendre en compte les fortes variations régionales qui existent et vont être amplifiées pour ces facteurs. Par exemple, alors que la réduction des pluies estivales pourrait affecter négativement *M. pini* dans certaines régions d'Europe, son explosion récente en Colombie britannique a été attribuée à une augmentation des pluies estivales dans les dernières décennies (Woods et al 2005). Notre approche met d'autre part en évidence l'importance non seulement des effets directs du climat sur la distribution des agents pathogènes mais également d'effets indirects via leurs hôtes préférentiels. Il n'existe encore que très peu d'études s'intéressant à la distribution spatiale d'espèces en interaction (voir par exemple Schweiger et al 2008, Watt et al 2011) et pas à notre connaissance sur une aussi large gamme d'espèces. La diversité des interactions hôte-pathogène (par exemple parasites obligatoires biotrophes/ parasites nécrotrophes à capacité saprophytique) rend difficile les généralisations concernant les effets potentiels du changement climatique (Shaw & Osborne 2011). La définition de groupes fonctionnels de réponse nécessiterait l'étude d'un plus grand

nombre d'espèces et la combinaison de plusieurs approches (voir par exemple Jactel et al 2012). Pour des prédictions plus spécifiques éventuellement plus adaptées à la gestion, notre étude devra être complétée par des projections à des dates intermédiaires. Enfin, notre étude met en évidence que pour certains parasites invasifs les facteurs climatiques n'ont pas imposé de limite à la colonisation de l'ensemble de la distribution d'une espèce-hôte en France au cours des dernières décennies. La menace de ces « nouvelles interactions » (Parker & Gilbert 2004), éventuellement favorisées par le changement climatique est une composante importante du changement global à prendre en compte (Loo 2009).

## Bibliographie

- Álvarez-Loayza P, White JF, Jr., Torres MnS, Balslev H, Kristiansen T, Svenning J-C, Gil N, 2011. Light Converts Endosymbiotic Fungus to Pathogen, Influencing Seedling Survival and Niche-Space Filling of a Common Tropical Tree, *Iriartea deltoidea*. *PLoS ONE* **6**: e16386.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD, 2010. Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* **19**: 5555-5565.
- Anderson RP, Gonzalez I, 2011. Species-specific tuning increases robustness to sampling bias in models of species distributions: An implementation with Maxent. *Ecological Modelling* **222**: 2796-2811.
- Araujo MB, New M, 2007. Ensemble forecasting of species distributions. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 42-47.
- Arnold AE, Henk DA, Eells RL, Lutzoni F, Vilgalys R, 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* **99**: 185-206.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological Research* **105**: 1502-1507.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA, 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* **3**: 267-274.
- Arnold AE, Mejia LC, Kyllo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 15649-15654.
- Arnold AE, Miadlikowska J, Higgins KL, Sarvate SD, Gugger P, Way A, Hofstetter Vr, Kauff F, Lutzoni Fo, 2009. A Phylogenetic Estimation of Trophic Transition Networks for Ascomycetous Fungi: Are Lichens Cradles of Symbiotrophic Fungal Diversification? *Systematic Biology* **58**: 283-297.
- Arnot DE, Roper C, Bayoumi RAL, 1993. Digital Codes from Hypervariable Tandemly Repeated DNA-Sequences in the *Plasmodium falciparum* Circumsporozoite Gene Can Genetically Barcode Isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* **61**: 15-24.
- Bailey JK, Deckert R, Schweitzer JA, Rehill BJ, Lindroth RL, Gehring C, Whitham TG, 2005. Host plant genetics affect hidden ecological players: links among *Populus*, condensed tannins, and fungal endophyte infection. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **83**: 356-361.
- Bailey JK, Hendry AP, Kinnison MT, Post DM, Palkovacs EP, Pelletier F, Harmon LJ, Schweitzer JA, 2009. From genes to ecosystems: an emerging synthesis of eco-evolutionary dynamics. *New Phytologist* **184**: 746-749.
- Baldrian P, Kolarik M, Stursova M, Kopecky J, Valaskova V, Vetrovsky T, Zifcakova L, Snajdr J, Ridl J, Vlcek C, Voriskova J, 2012. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *ISME J* **6**: 248-258.
- Baldwin RA, 2009. Use of Maximum Entropy Modeling in Wildlife Research. *Entropy* **11**: 854-866.
- Bass D, Richards TA, 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity on Earth and in the ocean. *Fungal Biology Reviews* **25**: 159-164.
- Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W, 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 99-108.

- Bellard C, Bertelsmeier C, Leadley P, Thuiller W, Courchamp F, 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters*: DOI: 10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x.
- Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H, ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *Bmc Microbiology* **10**.
- Bergot M, Cloppet, E., Pérarnaud, V., Déqué, M., Marçais, B., Desprez-Loustau, M.L., 2004. Simulation of potential range expansion of oak disease caused by *Phytophthora cinnamomi* under climate change. *Global Change Biology* **10**: 1539-1552.
- Berry D, Ben Mahfoudh K, Wagner M, Loy A, 2011. Barcoded Primers Used in Multiplex Amplicon Pyrosequencing Bias Amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 7846-7849.
- Blackwell M, 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million Species? *American Journal of Botany* **98**: 426-438.
- Bradley DJ, Gilbert GS, Martiny JBH, 2008. Pathogens promote plant diversity through a compensatory response. *Ecology Letters* **11**: 461-469.
- Brasier CM, Scott JK, 1994. European oak declines and global warming: a theoretical assessment with special reference to the activity of *Phytophthora cinnamomi*. *EPPO Bulletin* **24**: 221-232.
- Bresson CC, Vitasse Y, Kremer A, Delzon S, 2011. To what extent is altitudinal variation of functional traits driven by genetic adaptation in European oak and beech? *Tree Physiology* doi:10.1093/treephys/tpr084.
- Bridge PD, Spooner BM, Roberts PJ, 2003. Reliability and use of published sequence data. *New Phytologist* **161**: 15-17.
- Buck JW, Walcott RR, Beuchat LR, 2003. Recent Trends in Microbiological Safety of Fruits and Vegetables. *Online. Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
- Buee 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.
- Burdon JJ, Chilvers GA, 1982. Host Density as a Factor in Plant-Disease Ecology. *Annual Review of Phytopathology* **20**: 143-166.
- Cavender-Bares J, Kozak KH, Fine PVA, Kembel SW, 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters* **12**: 693-715.
- Cavender-Bares J, Wilczek A, 2003. Integrating micro- and macroevolutionary processes in community ecology. *Ecology* **84**: 592-597.
- Ciais P, Loustau D, Bosc A, Ogée J, Dufrêne E, François C, Davi H, Viovy N, Delage F, 2010. How will the production of French forests respond to climate change? An integrated analysis from site to country scale, pp. 201-227. In : *Forests, carbon cycle and climate change*, ed. D. Loustau, Quae, Paris.
- Clay K, Holah J, 1999. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science* **285**: 1742-1744.
- Coluccio AE, Rodriguez RK, Kernan MJ, Neiman AM, 2008. The Yeast Spore Wall Enables Spores to Survive Passage through the Digestive Tract of Drosophila. *Plos One* **3**.
- Courty PE, Buee M, Diedhiou AG, Frey-Klett P, Le Tacon F, Rineau F, Turpault MP, 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.
- Cullingham CI, Cooke JEK, Dang S, Davis CS, Cooke BJ, Coltman DW, 2011. Mountain pine beetle host-range expansion threatens the boreal forest. *Molecular Ecology* **20**: 2157-2171.

- Danovaro R, Luna GM, Dell'Anno A, Pietrangeli B, 2007. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: The emperor has no clothes - Authors' reply. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2399-2401.
- Danti R, Sieber, T.N., Sanguineti, G, 2002. Endophytic mycobiota in bark of European beech (*Fagus sylvatica*) in the Apennines. *Mycological research* **106**: 1343-1348.
- Dawkins R, 1982. *The Extended Phenotype* Oxford University Press, Oxford.
- de Wet J, Burgess T, Slippers B, Preisig O, Wingfield BD, Wingfield MJ, 2003. Multiple gene genealogies and microsatellite markers reflect relationships between morphotypes of *Sphaeropsis sapinea* and distinguish a new species of *Diplodia*. *Mycological Research* **107**: 557-566.
- Delmotte N, Knief C, Chaffron S, Innerebner G, Roschitzki B, Schlapbach R, von Mering C, Vorholt JA, 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16428-16433.
- Desprez-Loustau M-L, Courtecuisse R, Robin C, Husson C, Moreau P-A, Blancard D, Selosse M-A, Lung-Escarmant B, Piou D, Sache I, 2010. Species diversity and drivers of spread of alien fungi (sensu lato) in Europe with a particular focus on France. *Biological Invasions* **12**: 157-172.
- Desprez-Loustau ML, Marçais, B., Nageleisen, L.M., Piou, D., Vannini, A., 2006. Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science* **63**: 597-612.
- Desprez-Loustau ML, Robin, C., Reynaud G., Déqué, M., Badeau, V., Piou, D., Husson, C., Marçais, B., 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. *Plant Pathology* **29**: 101-120.
- Devictor V, Julliard, R., Couvet, D., Jiguet, F., 2008. Birds are tracking climate warming, but not fast enough. *Proc. R. Soc. B* **275**: 2743-2748.
- Dickie IA, 2010. Insidious effects of sequencing errors on perceived diversity in molecular surveys. *New Phytologist* **188**: 916-918.
- Edgar RC, 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Elith J, Graham CH, Anderson RP, Dudík M, Ferrier S, Guisan A, Hijmans RJ, Huettmann F, Leathwick JR, Lehmann A, Li J, Lohmann LG, Loiselle BA, Manion G, Moritz C, Nakamura M, Nakazawa Y, Overton JM, Peterson AT, Phillips SJ, Richardson K, Scachetti-Pereira R, Schapire RE, Soberon J, Williams S, Wisz MS, Zimmermann NE, 2006. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. *Ecography* **29**: 129-151.
- Elith J, Kearney M, Phillips S, 2010. The art of modelling range-shifting species. *Methods in Ecology and Evolution* **1**: 330-342.
- Elith J, Leathwick JR, 2009. Species Distribution Models: Ecological Explanation and Prediction Across Space and Time. In: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, pp. 677-697. Annual Reviews, Palo Alto.
- Elith J, Phillips SJ, Hastie T, Dudík M, Chee YE, Yates CJ, 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* **17**: 43-57.
- Enright AJ, Van Dongen S, Ouzounis CA, 2002. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Research* **30**: 1575-1584.
- Feeley KJ, Silman MR, 2011. Keep collecting: accurate species distribution modelling requires more collections than previously thought. *Diversity and Distributions* **17**: 1132-1140.
- Feldman T, O'Brien H, Arnold A, 2008. Moths that Vector a Plant Pathogen also Transport Endophytic Fungi and Mycoparasitic Antagonists. *Microbial Ecology* **56**: 742-750.

- Fierer N, 2008. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. In: *Assessing Uncultivated Microorganisms: from the Environment to Organisms and Genomes and Back* (ed. (editor). KZ), pp. 95-115. ASM Press, Washington DC.
- Fischer D, Thomas SM, Niemitz F, Reineking B, Beierkuhnlein C, 2011. Projection of climatic suitability for *Aedes albopictus* Skuse (Culicidae) in Europe under climate change conditions. *Global and Planetary Change* **78**: 54-64.
- Fitzpatrick DA, Logue ME, Butler G, 2008a. Evidence of recent interkingdom horizontal gene transfer between bacteria and *Candida parapsilosis*. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Fitzpatrick MC, Gove AD, Sanders NJ, Dunn RR, 2008b. Climate change, plant migration, and range collapse in a global biodiversity hotspot: the *Banksia* (Proteaceae) of Western Australia. *Global Change Biology* **14**: 1337-1352.
- Gange AC, Gange EG, Mohammad AB, Boddy L, 2011. Host shifts in fungi caused by climate change? *Fungal Ecology* **4**: 184-190.
- 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.
- Gazis R, Rehner S, Chaverri P, 2011. Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. *Molecular Ecology* **20**: 3001-3013.
- Gessler A, Keitel C, Kreuzwieser J, Matyssek R, Seiler W, Rennenberg H, 2007. Potential risks for European beech (*Fagus sylvatica* L.) in a changing climate. *Trees-Structure and Function* **21**: 1-11.
- Gilbert GS, 2002. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 13-43.
- Giraud T, Refregier G, Le Gac M, de Vienne DM, Hood ME, 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **45**: 791-802.
- Göre ME, Bucak C, 2007. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology* **37**: 281-288.
- Gury J, Zinger L, Gielly L, Taberlet P, Geremia RA, 2008. Exonuclease activity of proofreading DNA polymerases is at the origin of artifacts in molecular profiling studies. *ELECTROPHORESIS* **29**: 2437-2444.
- Harvell CD, Mitchell CE, Ward JR, Altizer S, Dobson AP, Ostfeld RS, Samuel MD, 2002. Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* **296**: 2158-2162.
- Hashizume Y, Sahashi N., Fukuda K., 2008. The influence of altitude on endophytic mycobiota in *Quercus acuta* leaves collected in two areas 1000 km apart *FOREST PATHOLOGY* **38**: 218-226.
- Hausdorf B, 2011. Progress toward a general species concept. *Evolution* **65**: 923-931.
- Hawksworth DL, 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* **95**: 641-655.
- Hawksworth DL, 2001. The magnitude of fungal diversity : the 1±5 million species estimate revisited. *Mycological Research* **105**: 1422-1432.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **270**: 313-321.
- Helaouët P, Beaugrand G, 2009. Physiology, Ecological Niches and Species Distribution. *Ecosystems* **12**: 1235-1245.
- Hendry SJ, Boddy, L., Lonsdale, D., 2002. Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagus sylvatica*). *New Phytologist* **155**: 449-460.

- Hernandez PA, Graham CH, Master LL, Albert DL, 2006. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* **29**: 773-785.
- Herrera ML, Vallor AC, Gelfond JA, Patterson TF, Wickes BL, 2009. Strain-Dependent Variation in 18S Ribosomal DNA Copy Numbers in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 1325-1332.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, Huhndorf S, James T, Kirk PM, Lücking R, Lumbsch HT, Lutzoni F, Matheny PB, McLaughlin DJ, Powell MJ, Redhead S, Schoch CL, Spatafora JW, Stalpers JA, Vilgalys R, Aime MC, Aptroot A, Bauer R, Begerow D, Benny GL, Castlebury LA, Crous PW, Dai YC, Gams W, Geiser DM, Griffith GW, Gueidan C, Hawksworth DL, Hestmark G, Hosaka K, Humber RA, Hyde KD, Ironside JE, Koljalg U, Kurtzman CP, Larsson KH, Lichtwardt R, Longcore J, Miadlikowska J, Miller A, Moncalvo JM, Mozley-Standridge S, Oberwinkler F, Parmasto E, Reeb V, Rogers JD, Roux C, Ryvarden L, Sampaio JP, Schussler A, Sugiyama J, Thorn RG, Tibell L, Untereiner WA, Walker C, Wang Z, Weir A, Weiss M, White MM, Winka K, Yao YJ, Zhang N, 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**: 509-547.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A, 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965-1978.
- Hoffman MT, Arnold AE, 2008. Geographic locality and host identity shape fungal endophyte communities in cupressaceous trees. *Mycological Research* **112**: 331-344.
- Howlett BJ, Rolls BD, Cozijnsen AJ, 1997. Organisation of ribosomal DNA in the ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Microbiological Research* **152**: 261-267.
- Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJM, 2001. Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4399-4406.
- Huson DH, Auch, A.F., Qi, J., Schuster, S.C., 2007. MEGAN Analysis of Metagenomic Data. *Genome Research* **17**: 377-386.
- Husson C, Scala B, Cael O, Frey P, Feau N, Ioos R, Marçais B, 2011. *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. *European Journal of Plant Pathology* **130**: 311-324.
- Hutchinson G, 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **22**: 415-427.
- Inácio J, Ludwig W, Spencer-Martins I, Fonseca Á, 2010. Assessment of phylloplane yeasts on selected Mediterranean plants by FISH with group- and species-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **71**: 61-72.
- Inácio J, Pereira P, Carvalho M, Fonseca Á, Amaral-Collaco MT, Spencer-Martins I, 2002. Estimation and Diversity of Phylloplane Mycobiota on Selected Plants in a Mediterranean-Type Ecosystem in Portugal. *Microbial Ecology* **44**: 344-353.
- IPCC, *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Jactel H, Petit J, Desprez-Loustau ML, Delzon S, Piou D, Battisti A, Koricheva J, 2012. Drought effects on damage by forest insects and pathogens: a meta-analysis. *Global Change Biology* **18**: 267-276.
- James TY, Kauff F, Schoch C, Matheny B, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Guiedan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch T, Rauhut A, Reeb V, Arnold A, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung G, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schueller A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW,

- Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot DM, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW, Vilgalys R, 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**: 818-822.
- Jarnevich CS, Reynolds LV, 2011. Challenges of predicting the potential distribution of a slow-spreading invader: a habitat suitability map for an invasive riparian tree. *Biological Invasions* **13**: 153-163.
- Jones MDM, Forn I, Gadelha C, Egan MJ, Bass D, Massana R, Richards TA, 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* **474**: 200-U234.
- Joshee S, Paulus BC, Park D, Johnston PR, 2009. Diversity and distribution of fungal foliar endophytes in New Zealand Podocarpaceae. *Mycological Research* **113**: 1003-1015.
- Jump AS, Hunt JM, Penuelas J, 2007. Climate relationships of growth and establishment across the altitudinal range of *Fagus sylvatica* in the Montseny Mountains, northeast Spain. *Ecoscience* **14**: 507-518.
- 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, 2010. Seasonally dynamic fungal communities in the *Quercus macrocarpa* phyllosphere differ between urban and nonurban environments. *New Phytologist* **186**: 496-513.
- Kanagawa T, 2003. Bias and Artifacts in Multitemplate Polymerase Chain Reactions(PCR). *J Biosci Bioeng* **96**: 317-323.
- Kearney M, Porter W, 2009. Mechanistic niche modelling: combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecology Letters* **12**: 334-350.
- Kinkel LL, 1997. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* **35**: 327-347.
- Kircher M, Kelso J, 2010. High-throughput DNA sequencing - concepts and limitations. *Bioessays* **32**: 524-536.
- Kirk PM, Cannon PF, Stalpers JA, Minter DW, 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th edn. CAB International.
- Klamt M, Thompson R, Davis J, 2011. Early response of the platypus to climate warming. *Global Change Biology* **17**: 3011-3018.
- Kõljalg U, Larsson KH, Abarenkov K, Nilsson RH, Alexander IJ, Eberhardt U, Erland S, Hoiland K, Kjøller R, Larsson E, Pennanen T, Sen R, Taylor AFS, Tedersoo L, Vralstad T, Ursing BM, 2005. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* **166**: 1063-1068.
- Körner C, 2007. The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in ecology & evolution* **22**: 569-574.
- Kou XJ, Li Q, Liu SR, 2011. Quantifying Species' Range Shifts in Relation to Climate Change: A Case Study of *Abies spp.* in China. *Plos One* **6**.
- Lamb TG, Tonkyn DW, Kluepfel DA, 1996. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 1112-1120.

- Lenoir J, Gégout, J.C., Marquet, P.A., de Ruffray, P., Brisse, H., 2008. A Significant Upward Shift in Plant Species Optimum Elevation During the 20th Century. *Science* **320**: 1768-1771.
- Levetin E, Dorsey K, 2006. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia* **22**: 3-12.
- Levin SA, 1992. The Problem of Pattern and Scale in Ecology. *Ecology* **73**: 1943-1967.
- 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.
- Lindner DL, Banik MT, 2011. Intra-genomic variation in the ITS rDNA region obscures phylogenetic relationships and inflates estimates of operational taxonomic units in genus *Laetiporus*. *Mycologia*: 10-331.
- Lindow SE, Brandl MT, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1875-1883.
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC, 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia* **88**: 733-738.
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenès JP, Godon JJ, 2006. Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8**: 720-731.
- Loo J, 2009. Ecological impacts of non-indigenous invasive fungi as forest pathogens. *Biological Invasions* **11**: 81-96.
- Lozier JD, Mills NJ, 2011. Predicting the potential invasive range of light brown apple moth (*Epiphyas postvittana*) using biologically informed and correlative species distribution models. *Biological Invasions* **13**: 2409-2421.
- Magarey RD, Fowler GA, Borchert DM, Sutton TB, Colunga-Garcia M, 2007. NAPPFAST: An internet system for the weather-based mapping of plant pathogens. *Plant Disease* **91**: 336-345.
- Manter DK, Weir TL, Vivanco JM, 2009. Negative Effects of Sample Pooling on PCR-Based Estimates of Soil Microbial Richness and Community Structure. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2086-2090.
- Marcais B, Dupuis F, DesprezLoustau ML, 1996. Modelling the influence of winter frosts on the development of the stem canker of red oak, caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Annales Des Sciences Forestieres* **53**: 369-382.
- Marchisio VF, Airaudi D, Barchi C, 1997. One-year monitoring of the airborne fungal community in a suburb of Turin (Italy) and assessment of its functional relations with the environment. *Mycological Research* **101**: 821-828.
- Marmion M, Parviainen M, Luoto M, Heikkinen RK, Thuiller W, 2009. Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Diversity and Distributions* **15**: 59-69.
- Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ, 2007. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance. *Science* **315**: 513-515.
- Mascheretti S, Croucher PJP, Vettraino A, Prospero S, Garbelotto M, 2008. Reconstruction of the Sudden Oak Death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Molecular Ecology* **17**: 2755-2768.
- Mayr E, 1940. Speciation phenomena in birds. *American Naturalist* **74**: 249-. 278.
- McCarthy JJ, 2009. Reflections On: Our Planet and Its Life, Origins, and Futures. *Science* **326**: 1646-1655.
- McCarty JP, 2001. Ecological Consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology* **15**: 320-331.

- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R, 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology* **17**: 488-497.
- Meyer CP, Paulay G, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology* **3**: 2229-2238.
- Michelland RJ, Dejean S, Combes S, Fortun-Lamothe L, Cauquil L, 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1359-1363.
- Minter DW, Staley JM, Millar CS, 1978. Four species of *Lophodermium* on *Pinus sylvestris*. *Transactions of the British Mycological Society* **71**: 295-301.
- Montesinos EM, Bonaterra AB, Badosa EB, Francés JF, Alemany JA, Llorente IL, Moragrega CM, 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology* **5**: 169-175.
- Moody SA, Newsham KK, Ayres PG, Paul ND, 1999. Variation in the responses of litter and phylloplane fungi to UV-B radiation (290-315 nm). *Mycological Research* **103**: 1469-1477.
- Morin X, Augspurger C, Chuine I, 2007. Process-based modeling of species' distributions: What limits temperate tree species' range boundaries? *Ecology* **88**: 2280-2291.
- Morlon H, Schwilk DW, Bryant JA, Marquet PA, Rebelo AG, Tauss C, Bohannan BJM, Green JL, 2011. Spatial patterns of phylogenetic diversity. *Ecology Letters* **14**: 141-149.
- Morris CE, Kinkel LL, 2002. Fifty years of phyllosphere microbiology: Significant contributions to research in related fields. In: *Phyllosphere Microbiology* (eds. Lindow SE, Hecht-Poinar EI, Elliott VJ), pp. 365-375. Amer Phytopathological Soc, St Paul.
- Morris SJ, Robertson G.P., 2005. Linking function between scales of resolution. In: *The Fungal Community* (ed. Dighton J, White, J.F., Oudemans, P.), pp. 13-26. Taylor & Francis Group.
- Mougou-Hamdane A, Giresse X, Dutech C, Desprez-Loustau M-L, 2010. Spatial distribution of lineages of oak powdery mildew fungi in France, using quick molecular detection methods. *Annals of Forest Science* **67**: DOI: 10.1051/forest/200910.
- Mougou A, Dutech C, Desprez-Loustau ML, 2008. New insights into the identity and origin of the causal agent of oak powdery mildew in Europe. *Forest Pathology* **38**: 275-287.
- 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.
- Newsham KK, Low MNR, McLeod AR, Greenslade PD, Emmett BA, 1997. Ultraviolet-B Radiation Influences the Abundance and Distribution of Phylloplane Fungi on Pedunculate Oak (*Quercus robur*). *New Phytologist* **136**: 287-297.
- Newton AC, Fitt BDL, Atkins SD, Walters DR, Daniell TJ, 2010. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology* **18**: 365-373.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH, 2008. Intraspecific ITS Variability in the Kingdom Fungi as Expressed in the International Sequence Databases and Its Implications for Molecular Species Identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* **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 Microbiology Letters* **296**: 97-101.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Koljalg U, 2006. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. *Plos One* **1**.

- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R, 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5544-5550.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA, 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Osono T, 2006. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 701-716.
- Osono T, Mori A, 2004. Distribution of phyllosphere fungi within the canopy of giant dogwood. *Mycoscience* **45**: 161-168.
- Parker IM, Gilbert GS, 2004. The evolutionary ecology of novel plant-pathogen interactions. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **35**: 675-700.
- Parmesan C, Yohe, G., 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* **421**.
- Pausas JG, Verdu M, 2010. The Jungle of Methods for Evaluating Phenotypic and Phylogenetic Structure of Communities. *Bioscience* **60**: 614-625.
- Pearson RG, Dawson TP, 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* **12**: 361-371.
- Peay KG, Kennedy PG, Bruns TD, 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *BioScience* **58**: 799-810.
- Pehl L, Butin H, 1994. Endophytische Pilze in Blättern von Laubbäumen und ihre Beziehungen zu Blattgallen (Zoocecidien). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* **297**: 1-56.
- Peñuelas J, Boada, M., 2003. A global change-induced biome shift in the Montseny mountains (NE Spain). *Global Change Biology* **9**: 131-140.
- Peñuelas J, Ogaya R, Boada M, S. Jump A, 2007. Migration, invasion and decline: changes in recruitment and forest structure in a warming-linked shift of European beech forest in Catalonia (NE Spain). *Ecography* **30**: 829-837.
- Petrini O, Fisher PJ, 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society* **91**: 233-238.
- Petrini O, Fisher PJ, 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research* **94**: 1077-1080.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE, 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* **190**: 231-259.
- Phillips SJ, Dudik M, 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* **31**: 161-175.
- Porrás-Alfaro A, Bayman P, 2011. Hidden Fungi, Emergent Properties: Endophytes and Microbiomes. In: *Annual Review of Phytopathology, Vol 49*, pp. 291-315. Annual Reviews, Palo Alto.
- Poulos HM, Chernoff B, Fuller PL, Butman D, 2012. Ensemble forecasting of potential habitat for three invasive fishes *Aquatic Invasions* **7**: 59-72.
- Powell JR, Monaghan MT, Öpik M, Rillig MC, 2011. Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. *Molecular Ecology* **20**: 655-666.
- Purvis A, Hector A, 2000. Getting the measure of biodiversity. *Nature* **405**: 212-219.
- Quince C, Lanzen A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT, 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639-U627.

- Ranjard L, Lejon, D. P. H., 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. *Environmental Microbiology* **5**: 1111–1120.
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM, 2002. Thermotolerance Generated by Plant/Fungal Symbiosis. *Science* **298**: 1581.
- Reed HE, Martiny JBH, 2007. Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 161-170.
- Reed KD, Meece JK, Archer JR, Peterson AT, 2008. Ecologic Niche Modeling of *Blastomyces dermatitidis* in Wisconsin. *Plos One* **3**.
- Reeder J, Knight R, 2009. The 'rare biosphere': a reality check. *Nature Methods* **6**: 636-637.
- Richards TA, 2011. Genome Evolution: Horizontal Movements in the Fungi. *Current Biology* **21**: 166-168.
- Robin C, Desprez-loustau ML, Delatour C, 1992. Factors Influencing the Enlargement of Trunk Cankers of *Phytophthora cinnamomi* in Red Oak. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* **22**: 367-374.
- Rodder D, Engler JO, 2011. Quantitative metrics of overlaps in Grinnellian niches: advances and possible drawbacks. *Global Ecology and Biogeography* **20**: 915-927.
- Rödder D, Lotters S, 2009. Niche shift versus niche conservatism? Climatic characteristics of the native and invasive ranges of the Mediterranean house gecko (*Hemidactylus turcicus*). *Global Ecology and Biogeography* **18**: 674-687.
- Rödder D, Lotters S, 2010. Explanative power of variables used in species distribution modelling: an issue of general model transferability or niche shift in the invasive Greenhouse frog (*Eleutherodactylus planirostris*). *Naturwissenschaften* **97**: 781-796.
- Rodriguez R, Redman R, 2007. More than 400 million years of evolution and plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance and habitat expansion via fungal symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **146**: 20.
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**: 314-330.
- Root TL, Price JT, Hall KR, Schneider SH, Rosenzweig C, Pounds JA, 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* **421**: 57-60.
- Rossello-Mora R, Amann R, 2001. The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews* **25**: 39-67.
- Rustchenko EP, Curran TM, Sherman F, 1993. Variations in the Number of Ribosomal DNA Units in Morphological Mutants and Normal Strains of *Candida albicans* and in Normal Strains of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **175**: 7189-7199.
- Sacks B, Chomel B, Kasten R, 2004. Modeling the distribution and abundance of the non-native parasite, canine heartworm, in California coyotes. *Oikos* **105**: 415-425.
- Sahashi N, Kubono, T., Miyasawa, Y., Ito, S., 1999. Temporal variations in isolation frequency of endophytic fungi of Japanese beech. *Canadian Journal of Botany* **77**: 197-202.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M, Sullivan TJ, 1998. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 319-343.
- Saunders M, Glenn AE, Kohn LM, 2010. Exploring the evolutionary ecology of fungal endophytes in agricultural systems: using functional traits to reveal mechanisms in community processes. *Evolutionary Applications* **3**: 525-537.
- Saunders M, Kohn LM, 2009. Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytologist* **182**: 229-238.

- Schulz B, Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**: 661-686.
- Schwarzenbach K, Enkerli J, Widmer F, 2007. Objective criteria to assess representativity of soil fungal community profiles. *Journal of Microbiological Methods* **68**: 358-366.
- Schweiger O, Settele J, Kudrna O, Klotz S, Kuhn I, 2008. Climate Change Can Cause Spatial Mismatch of Trophically Interacting Species. *Ecology* **89**: 3472-3479.
- Seifert KA, 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* **9**: 83-89.
- Shaw MW, Osborne TM, 2011. Geographic distribution of plant pathogens in response to climate change. *Plant Pathology* **60**: 31-43.
- Shendure J, Ji H, 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* **26**: 1135 - 1145.
- Sieber T, Hugentobler, C., 1987. Endophytic fungi in leaves and twigs of healthy and diseased beech trees (*Fagus sylvatica* L.). *EUROPEAN JOURNAL OF FOREST PATHOLOGY* **17**: 411-425.
- Slippers B, Stenlid J, Wingfield MJ, 2005. Emerging pathogens: fungal host jumps following anthropogenic introduction. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 420-421.
- Slippers B, Wingfield MJ, 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* **21**: 90-106.
- Stockinger H, Kruger M, Schussler A, 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **187**: 461-474.
- Stohlgren TJ, Ma P, Kumar S, Rocca M, Morisette JT, Jarnevich CS, Benson N, 2010. Ensemble Habitat Mapping of Invasive Plant Species. *Risk Analysis* **30**: 224-235.
- Suda W, Oto M, Amachi S, Shinoyama H, Shishido M, 2008. A Direct Method to Isolate DNA from Phyllosphere Microbial Communities without Disrupting Leaf Tissues. *Microbes and Environments* **23**: 248-252.
- Sutherst RW, Maywald GF, Yonow T, Stevens PM, 1999. *CLIMEX: predicting the effects of climate on plants and animals* Collingwood, Australia CSIRO Publishing.
- Talley S, Coley P, Kursar T, 2002. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecology* **2**: 7.
- Tanaka A, Christensen MJ, Takemoto D, Park P, Scott B, 2006. Reactive Oxygen Species Play a Role in Regulating a Fungus–Perennial Ryegrass Mutualistic Interaction. *The Plant Cell Online* **18**: 1052-1066.
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC, 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* **31**: 21-32.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, de Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Peterson AT, Phillips OL, Williams SE, 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* **427**: 145-148.
- Thompson IP, Bailey MJ, Fenlon JS, Fermor TR, Lilley AK, Lynch JM, McCormack PJ, McQuilken MP, Purdy KJ, Rainey PB, Whipps JM, 1993. Quantitative and Qualitative Seasonal-Changes in the Microbial Community from the Phyllosphere of Sugar-Beet (*Beta-Vulgaris*). *Plant and Soil* **150**: 177-191.
- Thuiller W, 2003. BIOMOD - optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Global Change Biology* **9**: 1353-1362.
- Thuiller W, Albert C, Arañójo MB, Berry PM, Cabeza M, Guisan A, Hickler T, Midgley GF, Paterson J, Schurr FM, Sykes MT, Zimmermann NE, 2008. Predicting global change impacts on plant species' distributions: future challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **9**: 137-152.

- 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.
- Unterseher M, Reiher A, Finstermeier K, Otto P, Morawetz W, 2007. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. *Mycological Progress* **6**: 201-212.
- Unterseher M, Schnittler M, 2009. Dilution-to-extinction cultivation of leaf-inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) – Different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment *Mycological Research* **113**: 645-654.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P, 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 110-117.
- Van Der Heijden MGA, Bardgett RD, Van Straalen NM, 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters* **11**: 296-310.
- Van der Putten WH, Macel M, Visser ME, 2010. Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**: 2025-2034.
- Vanbergen AJ, Raymond B, Pearce ISK, Watt AD, Hails RS, Hartley SE, 2003. Host shifting by *Operophtera brumata* into novel environments leads to population differentiation in life-history traits. *Ecological Entomology* **28**: 604-612.
- Venette RC, Cohen SD, 2006. Potential climatic suitability for establishment of *Phytophthora ramorum* within the contiguous United States. *Forest Ecology and Management* **231**: 18-26.
- Viret O, Scheidegger C, Petrini O, 1994. Infection of Beech Leaves (*Fagus-Sylvatica*) by the Endophyte *Discula-Umbrinella* (Teleomorph, *Apiognomonina-Errabunda*) - Low-Temperature Scanning Electron-Microscopy Studies. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* **71**: 1520-1527.
- Vitousek PM, 1994. Beyond Global Warming: Ecology and Global Change. *Ecology* **75**: 1861-1876.
- Vralstad T, 2011. ITS, OTUs and beyond—fungal hyperdiversity calls for supplementary solutions. *Molecular Ecology* **20**: 2873-2875.
- Vujanovic V, Brisson J, 2002. A comparative study of endophytic mycobiota in leaves of *Acer saccharum*; in eastern North America. *Mycological Progress* **1**: 147-154.
- Walther GR, Post, E., Convey, P., Menzel, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J.M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**.
- Warren DL, Seifert SN, 2011. Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications* **21**: 335-342.
- Watt MS, Kriticos DJ, Alcaraz S, Brown AV, Leriche A, 2009. The hosts and potential geographic range of *Dothistroma* needle blight. *Forest Ecology and Management* **257**: 1505-1519.
- Watt MS, Stone JK, Hood IA, Manning LK, 2011. Using a climatic niche model to predict the direct and indirect impacts of climate change on the distribution of Douglas-fir in New Zealand. *Global Change Biology* **17**: 3608-3619.
- Webb CO, Ackerly DD, McPeck MA, Donoghue MJ, 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 475-505.

- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (ed. Innis MA, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White), pp. 315-322. Academic Press, Inc., New York.
- Whitham TG, Young WP, Martinsen GD, Gehring CA, Schweitzer JA, Shuster SM, Wimp GM, Fischer DG, Bailey JK, Lindroth RL, Woolbright S, Kuske CR, 2003. Community and ecosystem genetics: A consequence of the extended phenotype. *Ecology* **84**: 559-573.
- Wiemers M, Fiedler K, 2007. Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* **4**: 8.
- Wilkinson HH, Siegel MR, Blankenship JD, Mallory AC, Bush LP, Schardl CL, 2000. Contribution of fungal loline alkaloids to protection from aphids in a grass-endophyte mutualism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1027-1033.
- Will KW, Mishler BD, Wheeler QD, 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* **54**: 844-851.
- Will KW, Rubinoff D, 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics-the International Journal of the Willi Hennig Society* **20**: 47-55.
- Wilson D, Carroll GC, 1994. Infection Studies of *Discula-Quercina*, an Endophyte of *Quercus-Garryana*. *Mycologia* **86**: 635-647.
- Wilson M, Hirano SS, Lindow SE, 1999. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1435-1443.
- Witt JDS, Threlloff DL, Hebert PDN, 2006. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology* **15**: 3073-3082.
- Wolfe BE, Richard F, Cross HB, Pringle A, 2010. Distribution and abundance of the introduced ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* in North America. *New Phytologist* **185**: 803-816.
- Wollan AK, Bakkestuen V, Kauserud H, Gulden G, Halvorsen R, 2008. Modelling and predicting fungal distribution patterns using herbarium data. *Journal of Biogeography* **35**: 2298-2310.
- Woods A, Coates KD, Hamann A, 2005. Is an unprecedented dothistroma needle blight epidemic related to climate change? *Bioscience* **55**: 761-769.
- Wulff EG, van Vuurde JW, Hockenhull J, 2003. The ability of the biological control agent *Bacillus subtilis*, strain BB, to colonise vegetable brassicas endophytically following seed inoculation. *Plant and Soil* **255**: 463-474.
- Xie JT, Fu YP, Jiang DH, Li GQ, Huang JB, Li B, Hsiang T, Peng YL, 2008. Intergeneric transfer of ribosomal genes between two fungi. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Yonow T, Kriticos DJ, Medd RW, 2004. The potential geographic range of *Pyrenophora semeniperda*. *Phytopathology* **94**: 805-812.
- Zinger L, Coissac E, Choler P, Geremia RA, 2009. Assessment of Microbial Communities by Graph Partitioning in a Study of Soil Fungi in Two Alpine Meadows. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 5863-5870.
- Zinger L, Gury J, Alibeu A, 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. *Journal of Microbiological Methods* **72**: 42-53.



La phyllosphère est l'habitat fourni par la partie foliaire des plantes. De nombreuses espèces microbiennes - pathogènes, saprophytes ou mutualistes des plantes - peuplent cet environnement. Ce compartiment microbien influence donc la dynamique et la structure des communautés végétales.

L'objectif principal de cette thèse était d'étudier les effets potentiels du changement climatique sur la structure des assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers, et sur la niche écologique des espèces fongiques pathogènes des arbres forestiers. Nous avons pour cela utilisé deux approches, i) l'étude de gradients altitudinaux et ii) la construction de modèles de niche bioclimatique. Les assemblages fongiques de la phyllosphère des arbres forestiers étant encore peu connus, nous avons dans un premier temps décrit leur diversité et quantifié leur variabilité spatiale à l'échelle d'une parcelle forestière.

Nos résultats montrent que la phyllosphère d'un arbre forestier abrite quelques centaines d'espèces fongiques, avec quelques espèces dominantes et beaucoup d'espèces rares. Les facteurs structurant ces assemblages incluent à la fois des facteurs abiotiques et biotiques : la température apparaît comme la variable climatique la plus explicative le long d'un gradient altitudinal ; à l'échelle d'une parcelle, la proximité génétique entre arbres est plus déterminante que leur distance géographique. L'analyse des modèles de niche des champignons pathogènes forestiers à l'échelle de la France met en évidence des limitations climatiques, les pluies estivales étant une variable explicative importante. Toutefois, plusieurs espèces introduites occupent déjà la plus grande part de la distribution de leur hôte, sans limitation apparente par le climat. Les effets du changement climatique sur la plupart des pathogènes s'exerceront d'abord indirectement par des effets dépressifs très importants sur l'abondance de leurs arbres-hôtes. Seuls les pathogènes adaptés au biotope méditerranéen verraient leur impact s'accroître.

Mot clefs : Phyllosphère, champignons, *Fagus sylvatica*, changement climatique, gradient altitudinal, pyroséquençage 454, modèle de niche, santé des forêts.

Phyllosphere is the habitat provided by the leaves of living plants. Many microbial species - pathogens, saprophytes or mutualists of plants - inhabit this environment. These microbes therefore influence the dynamics and structure of plant communities.

The main objective was to study the potential effects of climate change on the structure of phyllosphere fungal assemblages, and on the ecological niche of pathogenic fungal species of forest trees. We used two approaches, i) the study of altitudinal gradients and ii) the construction of bioclimatic niche models. Since phyllosphere fungal assemblages of forest trees are still poorly known, we first described their diversity and quantified their spatial variability at the scale of a forest stand.

Our results show that the phyllosphere of a forest tree houses hundreds of fungal species, with few dominant species and many rare species. Factors structuring these assemblages include both abiotic and biotic factors: the temperature appears as the most explanatory variable along an elevational gradient. At the scale of a forest stand, the genetic proximity between trees is more important than the geographic distance. Analysis of the bioclimatic niche models of pathogenic fungi forest at the French scale highlights some climatic limitations, and the summer rainfall is an important explanatory variable. However, many introduced species already occupy the distribution of their host, without apparent climatic limitation. The effects of climate change on most pathogens will be exercised indirectly by very important depressive effects on the abundance of their host trees. Only pathogens adapted to the Mediterranean biotope would increase their impact.

Keywords: Phyllosphere, fungi, *Fagus sylvatica*, change climate, elevation gradient, 454 pyrosequencing, niche model, forest health.